



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Licenciatura en Ciencia y Tecnología de los Alimentos



# UTILIZACIÓN DE ALMIDÓN RESISTENTE EN LA OBTENCIÓN DE PRODUCTOS PANIFICADOS SALUDABLES.

Tesis de grado

Carlos Gabriel Arp

La Plata, marzo de 2014.



El presente trabajo fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) – Facultad de Ciencias Exactas – UNLP, para obtener el grado académico de Licenciado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, bajo la dirección de la **Dra. María Jimena Correa** y la **Dra. Cristina Ferrero**.

## Resumen

El almidón resistente es un ingrediente funcional que, a diferencia del almidón convencional, resiste la digestión en el intestino delgado de individuos sanos. Es así que su aporte calórico es mínimo, y atraviesa el tracto digestivo actuando como fibra y funcionando como sustrato para bacterias colónicas beneficiosas. El presente trabajo pretende reemplazar parcialmente la harina de trigo por almidón resistente a diferentes niveles obteniendo una masa adecuada para el proceso de panificación y un producto final de calidad aceptable. Este producto tendría características similares a las del pan común, pero con un aporte calórico reducido, lo que permitiría su incorporación en regímenes especiales que requieran menor contenido glucídico y un aporte de fibra incrementado. Se espera que los resultados obtenidos permitan optimizar la aplicación de almidón resistente en masas panarias con el objeto de lograr productos panificados funcionales.

La harina de trigo y sus formulaciones con sal y almidón resistente se caracterizaron mediante ensayos farinográficos. La reología de las masas resultantes se analizó a través de ensayos en reómetro oscilatorio y análisis de perfil de textura. Mediante microscopía confocal láser de barrido se analizó la microestructura de la red de gluten de las masas. Las transiciones térmicas que ocurren en la masa durante el horneado se estudiaron mediante calorimetría diferencial de barrido.

Se confeccionaron curvas de fermentación para determinar tiempos de fermentación óptimos para realizar las panificaciones. El estudio de la calidad de los productos panificados incluyó determinación de volumen específico de pan, análisis del alveolado de la miga y colorimetría de la corteza. Los ensayos de almacenamiento incluyeron análisis de perfil de textura de la miga de pan, humedad de la miga y análisis de la retrogradación del almidón en el pan mediante calorimetría diferencial de barrido luego de diferentes períodos de almacenamiento.

Para estimar el índice glicémico de los panes, se realizaron ensayos enzimáticos de digestibilidad *in-vitro* de los productos.

En general, el reemplazo de harina de trigo por almidón resistente condujo a la obtención de masas con características reológicas y texturales aptas para la panificación. Los panes resultantes vieron afectada su calidad final, manteniendo igualmente una buena aceptabilidad. Además, se encontró que los panes con almidón resistente presentaron una tasa glicémica *in-vitro* considerablemente baja respecto del control.

# **AGRADECIMIENTOS**



A la Universidad Nacional de La Plata y a todos los docentes de la Facultad de Ciencias Exactas por la formación que me han brindado y el empeño en sus labores.



Al personal del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), y particularmente al Grupo de Cereales, por darme el espacio y la compañía para realizar este trabajo.



Al Centro de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, por haberme adjudicado la Beca de Entrenamiento.



A Molino Campodónico S.A. por la harina que usé a lo largo de todo el trabajo.



A la Dra. Ángela Zuleta, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA por el almidón resistente donado para la realización del trabajo.



A Molinos Río de La Plata S.A. por haber facilitado el uso del farinógrafo y el alveógrafo.



A Jimena y Cristina, por aceptar ser mis directoras, por su calidez, comprensión y predisposición. Por brindarme su tiempo, por los conocimientos y la formación que me han sabido transmitir.



A los amigos que me dio la Facultad: Flor, Celes, Jaz, Anita, Leo, Eze y Diego. Por las risas compartidas y todos los momentos juntos.



A mis amigos de la promoción de Alimentos: Lu D., Lu P., Lu V., Fer, Flor, Dolo, Eli, Sabri, Facu, Vic y Emi. Por conformar el perfecto final de la carrera.



A mis amigos de siempre: Gise, Carito, Chino, Franco y Didi. Por ser la mejor compañía, por los años juntos y separados, pero juntos.



A mis padres, que han sido el apoyo incondicional a lo largo de todo el trayecto por la Facultad, por su cariño. Y a mis hermanos, por lo mismo.



A mis abuelos: Isabel, Rosa y Tomás. Por su cariño y el apoyo que me brindaron siempre.



A Francisco, por su cariño, calidez, paciencia, apoyo, asesoramiento y mucho más. Por estar a mi lado en todo este trayecto, y brindarme todo de sí.



A Meli, por su empatía. Sí.

# Índice

1. Introducción .....	9
1.1. Panificados .....	10
1.1.1. Fenómenos asociados a las distintas etapas del proceso de panificación .....	11
1.1.1.1. Amasado .....	12
1.1.1.2. Fermentación.....	12
1.1.1.3. Cocción.....	12
1.1.2. Rol de los principales constituyentes de la harina.....	13
1.1.2.1. Rol de las proteínas .....	13
1.1.2.2. Rol del almidón.....	16
1.2. Alimentos funcionales .....	19
1.3. Panificados saludables.....	21
1.3.1. Almidón resistente como ingrediente funcional en panificados .....	23
2. Hipótesis y objetivos.....	26
2.1. Hipótesis .....	27
2.2. Objetivos.....	27
2.2.1. Objetivo general .....	27
2.2.2. Objetivos específicos .....	27
3. Materiales y métodos .....	28
3.1. Materiales .....	29
3.1.1. Materias primas .....	29
3.1.2. Preparación de las mezclas .....	30
3.2. Métodos .....	31
3.2.1. Caracterización de harina y mezclas a través de ensayos farinográficos .....	31
3.2.2. Preparación de las masas para ensayos reológicos .....	32
3.2.3. Ensayos reológicos fundamentales y empíricos en masa .....	33
3.2.3.1. Ensayos de reometría oscilatoria.....	33
3.2.3.2. Análisis del perfil de textura (TPA).....	36
3.2.4. Análisis microestructural .....	38
3.2.4.1. Preparación de la masa para análisis microestructural.....	38
3.2.4.2. Análisis microestructural por microscopía confocal láser de barrido (CSLM) ..	38
3.2.4.2.1. Procesamiento de imágenes para el cálculo de D y PMV .....	39
3.2.4.3. Transiciones térmicas del almidón en masa panaria .....	40
3.2.5. Panificación .....	42
3.2.5.1. Formulación de productos panificados .....	42

3.2.5.2. Curvas de fermentación .....	42
3.2.5.3. Obtención de productos panificados .....	43
3.2.6. Análisis de calidad de los panes .....	44
3.2.6.1. Volumen específico .....	44
3.2.6.2. Alveolado de la miga .....	45
3.2.6.3. Color de la corteza .....	47
3.2.6.4. Ensayos de almacenamiento .....	47
3.2.6.4.1. Humedad de la miga .....	48
3.2.6.4.2. Textura de la miga.....	48
3.2.6.4.3. Retrogradación del almidón .....	48
3.2.7. Digestibilidad <i>in-vitro</i> del almidón .....	49
3.2.8. Análisis estadístico .....	50
4. Resultados y discusión.....	51
4.1. Caracterización de harina y mezclas .....	52
4.2. Viscoelasticidad en reómetro oscilatorio .....	53
4.2.1. Determinación del rango de viscoelasticidad lineal.....	53
4.2.2. Espectros mecánicos .....	54
4.2.3. Análisis de perfil de textura (TPA) en masa .....	57
4.3. Análisis microestructural .....	59
4.3.1. Análisis microestructural por microscopía confocal láser de barrido (CSLM) .....	59
4.3.2. Gelatinización del almidón en masa .....	62
4.4. Ensayos en productos panificados .....	64
4.4.1. Curvas de fermentación .....	64
4.4.2. Análisis de calidad de los panes.....	67
4.4.2.1. Volumen específico de pan.....	67
4.4.2.2. Alveolado de la miga .....	68
4.4.2.3. Color de la corteza .....	71
4.4.2.4. Ensayos de almacenamiento.....	72
4.4.2.4.1. Humedad de la miga .....	72
4.4.2.4.2. Textura de la miga de los panes almacenados.....	73
4.4.2.4.3. Retrogradación .....	76
4.5. Evaluación nutricional: determinación de la digestibilidad del almidón .....	78
5. Conclusiones .....	80
6. Referencias.....	83



# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1. Panificados

A través del proceso de panificación se busca obtener un producto esponjoso y apetitoso a partir de la harina de trigo: el pan, el cual es uno de los alimentos procesados más antiguos y más ampliamente consumidos por la humanidad (Dewettinck y col., 2008). De hecho, en uno de los papiros más antiguos encontrados parece haber un conjunto de instrucciones para la elaboración de pan. Otro documento egipcio encontrado informa sobre problemas en la construcción de las pirámides debido a que el suministro de cerveza y pan a los trabajadores había sido insuficiente, lo que revela que algunos tópicos de la dieta humana han cambiado relativamente poco en miles de años (Edwards, 2007).

En nuestro medio, los productos panificados constituyen una parte importante de la dieta. El consumo anual per cápita en la Argentina se estima en 70,6 kg para pan artesanal y 4,6 kg para pan industrial. El incremento en un 13% del consumo de pan industrial entre 2009 y 2010 se atribuye a una mayor oferta de variedades, entre ellos los panes con ingredientes funcionales, y a la mayor participación de marcas del distribuidor en el mercado (Lezcano, 2011).

El Código Alimentario Argentino (CAA), en el artículo 725 del Capítulo IX, define al pan como: “el producto obtenido por la cocción en hornos y a temperatura conveniente de una masa fermentada o no, hecha con harina y agua potable, con o sin el agregado de levadura, con o sin la adición de sal, con o sin la adición de otras sustancias permitidas para esta clase de productos alimenticios”. Y en el artículo 726 define como Pan, Pan blanco, Pan francés, o Pan tipo francés, al “producto obtenido por la cocción de una masa hecha con harina, agua potable y sal en cantidad suficiente, amasada en forma mecánica y fermentada por el agregado de masa agria y/o levaduras”. Además, establece que el pan debe presentar miga porosa, elástica y homogénea y corteza de color uniforme amarillo-dorado. Asimismo, debe ser de olor y sabor agradables y no debe contener más de 3,25% de cenizas totales calculadas sobre substancia seca.

La harina de trigo debe su capacidad para formar una masa viscoelástica a las proteínas de reserva del grano y son éstas las que permiten la obtención del pan. Las diferencias principales entre las distintas formas de panificación se encuentran en la mezcla, amasado, incorporación de aire, formación y desarrollo del gluten. La subdivisión de la masa y las etapas del proceso que afectan a las piezas individuales modifican la calidad del producto, aunque dicha calidad se genere durante el desarrollo de la masa, dando lugar a un amplio abanico de productos que difieren en forma, tamaño, textura, sabor, etc.

Los cambios deseables resultantes de un desarrollo óptimo de la masa están asociados a la capacidad de la masa de retener burbujas de gas (CO<sub>2</sub>) y permitir, durante las fases de fermentación y horneado, la expansión uniforme de la pieza. Para mejorar la retención de gas es deseable obtener masas extensibles. Además, la reducción de la resistencia y elasticidad son importantes en la modificación de la estructura de las burbujas durante el proceso (Cauvain, 2002).

### 1.1.1. Fenómenos asociados a las distintas etapas del proceso de panificación

En la Tabla 1.1 se resumen los principales fenómenos que ocurren durante el proceso de panificación. Se desarrollarán en profundidad aquellos procesos que revisten mayor importancia para el presente trabajo.

**Tabla 1.1. Proceso de panificación (apuntes de cátedra: Nutrición y Bromatología, 2013).**

<b>Tamizado de la harina</b>	Eliminación de partículas extrañas
<b>Mezclado de los ingredientes y amasado</b> 10 – 20 minutos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Absorción de agua</li> <li>• Desarrollo de elasticidad y extensibilidad del gluten -SH + HS- ↔ -S-S-</li> <li>• Interacción proteínas – glicolípidos – almidón</li> </ul>
<b>Corte y moldeado</b>	Aproximación de tamaño y forma de las piezas
<b>Fermentación</b> T = 23 – 28 °C 2 – 3 hs Humedad relativa controlada ( ≥ 75%)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dilatación de la masa</li> <li>• Evaporación de agua</li> <li>• Dilatación del aire</li> <li>• Generación de CO<sub>2</sub> por acción de levaduras o leudantes químicos</li> </ul>
<b>Cocción en horno</b> T externa ≈ 230 °C T interna < 100 °C T superficie ≈ 195 °C	<p><b>En corteza:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Desecación</li> <li>• Pardeamiento no enzimático (Maillard)</li> <li>• Formación de maltol (flavor)</li> </ul> <p><b>En miga:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Gelatinización parcial del almidón</li> <li>• Pérdida de vitamina B<sub>1</sub></li> <li>• Muerte de levaduras</li> <li>• Inactivación de amilasas</li> <li>• Coagulación de proteínas (albúminas y globulinas)</li> <li>• Pérdida de agua (contenido final del 45%)</li> </ul>
<b>Enfriamiento</b> T = 21 °C HR controlada (80%)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evitar cambios de textura por migración de agua</li> <li>• Evitar pérdida de peso</li> </ul>
<b>Envejecimiento del pan</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Retrogradación de amilosa y amilopectina</li> <li>• Pérdida de humedad</li> </ul>

#### 1.1.1.1. Amasado

En el comienzo del amasado ocurre la dispersión uniforme de los ingredientes seguida por la disolución y la hidratación de la harina, en particular de las proteínas y del almidón dañado. El proceso más importante que sucede durante esta etapa gracias al aporte de energía mecánica es el desarrollo de la red de gluten, una matriz cohesiva y viscoelástica. Además, el amasado permite la incorporación de aire a la masa. El  $O_2$  proveniente del aire es consumido por las levaduras y el  $N_2$  proporciona el núcleo de la burbuja a cuyo interior puede difundir el  $CO_2$  formado durante la fermentación. Al finalizar el amasado, la masa panaria presenta las características viscoelásticas óptimas para el procesado posterior (Belton, 2003). La obtención de un pan de buena calidad se encuentra determinada por las características de la masa formada durante la etapa de amasado, siendo éste un paso crítico de la panificación. Del mismo depende la capacidad de la masa para retener el gas generado durante la fermentación (Gan y col., 1995) y el adecuado balance entre el flujo viscoso y la fuerza elástica, el cual depende también de las características del gluten.

#### 1.1.1.2. Fermentación

En esta etapa la pieza ya moldeada se relaja. Se produce una expansión de la masa debido a la producción de  $CO_2$  por las levaduras, obteniéndose una pieza aireada y esponjosa. El grado en que las levaduras puedan acceder a los azúcares para llevar adelante la fermentación está determinado por dos factores principales: la concentración de almidón dañado y la actividad de la  $\alpha$ -amilasa. En esta etapa se determinan en gran medida la forma y el volumen requeridos para el momento del horneado. En la fermentación también se producen cambios en la composición de la matriz por los productos formados durante la misma como etanol y  $CO_2$ , y por la acción de las proteasas de la harina, contribuyendo a la aparición de las propiedades organolépticas características.

#### 1.1.1.3. Cocción

Durante esta etapa la masa sufre una serie de importantes modificaciones debido a la exposición a altas temperaturas, las cuales conducen a la obtención del

pan. Ocurre una rápida expansión del gas en la masa, eliminación de agua, gelatinización del almidón y coagulación de las proteínas. Debido a que diferentes zonas del pan se exponen a diferentes temperaturas, las reacciones también ocurren en forma diversa en cada zona. Así es como se desarrolla la corteza en la superficie donde la evaporación del agua es intensa (temperaturas de 160 °C), mientras que en el interior de la pieza, donde la pérdida de humedad es menor, se conserva la esponjosidad (temperaturas de 96 °C).

Durante los primeros minutos de horneado, previos a la muerte de las levaduras, se genera la mayor cantidad de CO<sub>2</sub> por lo que la masa continúa expandiéndose. La masa debe tener la capacidad de retener el gas que se está formando, lo cual sólo puede lograrse si se ha formado una adecuada estructura del gluten durante el amasado (Maloney y Foy, 2003).

#### 1.1.2. Rol de los principales constituyentes de la harina

##### 1.1.2.1. Rol de las proteínas

Las proteínas de la harina de trigo pueden diferenciarse según la clasificación de Osborne para cereales en albúminas, globulinas, gliadinas y gluteninas. Los dos primeros grupos de proteínas no pertenecen al gluten. Representan entre el 15 y el 20% de las proteínas totales y son principalmente proteínas estructurales, enzimas, inhibidores enzimáticos, etc. Son hidrosolubles y de poca relevancia, con excepción de la  $\alpha$ -amilasa, en el proceso de panificación. Las gliadinas y gluteninas, en cambio, son la fracción de proteínas que conforman el gluten. Constituyen entre el 80 y el 85% de la proteína total y son fundamentales en el proceso de panificación. Con el término de gluten se designa a la red que forman gluteninas y gliadinas hidratadas durante el amasado.

En las tablas 1.2 y 1.3 se expone un breve detalle de las proteínas del gluten, gliadinas y gluteninas, respectivamente.

**Tabla 1.2. Características de las gliadinas.**

	PM	Tipo	Características	Subunidad
G L I A D I N A S	30 – 50 kDa	α/β	Dominio N-terminal repetitivo rico en Gln (puentes de H), Pro, Phe y Tyr (interacciones hidrofóbicas) <sup>1,2</sup> Dominio C-terminal no repetitivo con 6 residuos Cys <sup>3</sup> 3 puentes S-S intracatenarios. Sin intercatenarios <sup>3</sup>	No posee
		γ	Dominio N-terminal repetitivo rico en Gln (puentes de H), Pro, Phe y Tyr (interacciones hidrofóbicas) <sup>1,2</sup> Dominio C-terminal no repetitivo con 8 residuos Cys <sup>3</sup> 4 puentes S-S intracatenarios. Sin intercatenarios <sup>3</sup>	
		ω	Alto contenido (80%) de Gln (puentes de H <sup>4</sup> ) Pro y Phe <sup>5</sup> Sin puentes S-S <sup>5</sup>	

<sup>1</sup> Lindsay y Skerritt, 1999.

<sup>2</sup> Tatham y Shewry, 1995.

<sup>3</sup> Grosch y Wieser, 1999.

<sup>4</sup> Fido y col., 1997.

<sup>5</sup> Wieser, 2007.

**Tabla 1.3. Características de las gluteninas.**

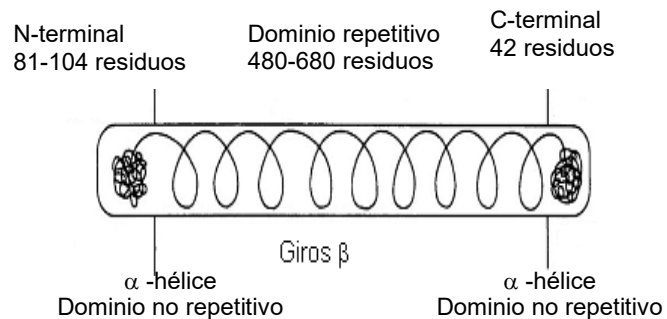
	PM	Tipo	Características	Subunidad	Características. de la subunidad
G L U T E N I N A S	5x10 <sup>6</sup> – 1x10 <sup>7</sup> Da (Grandes agregados unidos por puentes S-S) <sup>1</sup>	HMW-GS (33,3%)	Dominio central repetitivo con giros β Dominios N y C-terminales globulares Puentes S-S intracatenarios e intercatenarios	X	83 – 88 kDa C-terminal: 1 Cys N-terminal: 3 Cys
				Y	67 – 74 kDa C-terminal: 1 Cys N-terminal: 5 Cys
		LMW-GS (66,7%)	Puentes S-S intracatenarios e intercatenarios con el macropolímero de gluteninas	B	Número par de Cys Extendidora de cadena <sup>2</sup>
				C	Algunas tienen número impar de Cys Terminadora de cadena <sup>2</sup>
				D	--

<sup>1</sup> Wieser, 2007.

<sup>2</sup> Lindsay y Skerritt, 1999.

Si bien tanto las gliadinas como las gluteninas exhiben puentes disulfuro intracatenarios estabilizando su conformación, la capacidad de formación de puentes intercatenarios es exclusiva de las gluteninas por lo que se ha propuesto que el macropolímero en la masa está constituido por un esqueleto formado por uniones disulfuro entre subunidades HMW-GS (Figura 1.1), las cuales también capaces de establecer enlaces disulfuro con las LMW-GS. En la

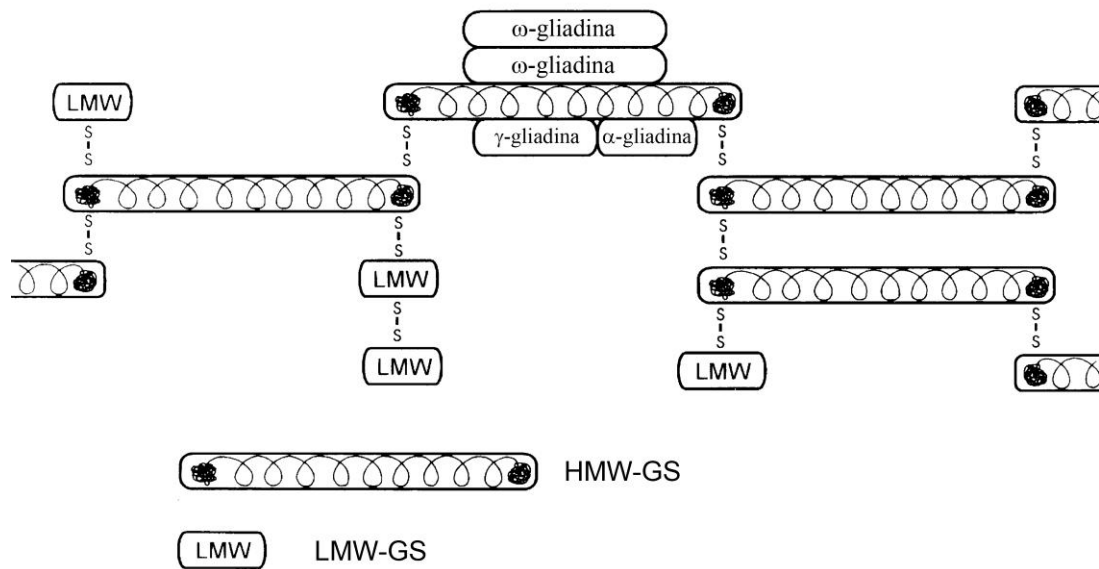
Figura 1.2 se muestra el modelo estructural propuesto para el gluten según Shewry y col. (2001), en el cual las HMW-GS forman el esqueleto a través de uniones disulfuro “cabeza-cola” entre ellas, ordenamiento que otorga las propiedades viscoelásticas a



**Figura 1.1. Subunidad de gluteninas de alto peso molecular (Adaptado de Shewry y col., 2001).**

la masa debido a la repetición de estructuras tipo giro- $\beta$  que podrían extenderse actuando como resortes (Tatham y Shewry, 1995). Las LMW-GS se unen a esta estructura a través de enlaces disulfuro formando las ramificaciones. En general, las LMW-GS se relacionan con la resistencia y la extensibilidad de la masa (Metakovskii y col., 1990; Cornish y col., 2001). En este esquema las gliadinas interactúan a través de fuerzas no covalentes con el dominio central de las HMW-GS mediante interacciones puentes de hidrógeno probablemente entre las amidas de los residuos de glutamina. Estas interacciones son muy importantes porque contribuyen a la viscoelasticidad de la masa aportando plasticidad y viscosidad (Ewart, 1989; Jeffrey y Saenger, 1994; Belton, 1999).

La red de gluten se caracteriza por su notable capacidad de deformarse. Sin embargo, para la obtención de un producto panificado de buena calidad, se requiere de un correcto balance entre tenacidad y extensibilidad, adecuado para retener los gases durante la fermentación y el horneado. Existen dos factores determinantes de este balance: la relación gliadinas/gluteninas, y la calidad de las gluteninas. Las gluteninas contribuyen con elasticidad y resistencia a la deformación, mientras que las gliadinas otorgan plasticidad y viscosidad a la red (Belton, 1999 y 2003).



**Figura 1.2. Modelo estructural propuesto para el gluten (Shewry y col., 2001).**

Durante el amasado, el gluten es capaz de hidratarse absorbiendo una gran cantidad de agua. Además, puede interactuar con los demás componentes de la harina, sean estos almidón, polisacáridos no almidonosos y lípidos (Carr y col., 1992; Bettge y Morris, 2000; Lee y col., 2001).

#### 1.1.2.2. Rol del almidón

El almidón es el polisacárido de reserva del grano de trigo y se encuentra en las células del endosperma organizado en forma de estructuras denominadas gránulos. Está constituido por dos polímeros, amilosa (aproximadamente 25%) y amilopectina (aproximadamente 75%), cuyo monómeros son unidades de glucosa. Los enlaces entre glucosas en la cadena de amilosa son de tipo  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4), sin presentar ramificaciones en cantidad significativa. El grado de polimerización de la amilosa se encuentra entre 500 y 6000 residuos; sus cadenas presentan una conformación helicoidal, con los grupos hidroxilo orientados hacia afuera. El interior de la hélice constituye un entorno no polar que puede alojar moléculas con carácter hidrofóbico tales como los ácidos grasos o  $I_2$ . Los enlaces en la amilopectina son de tipo  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) en las regiones lineales, que pueden formar dobles hélices y de tipo  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) en las



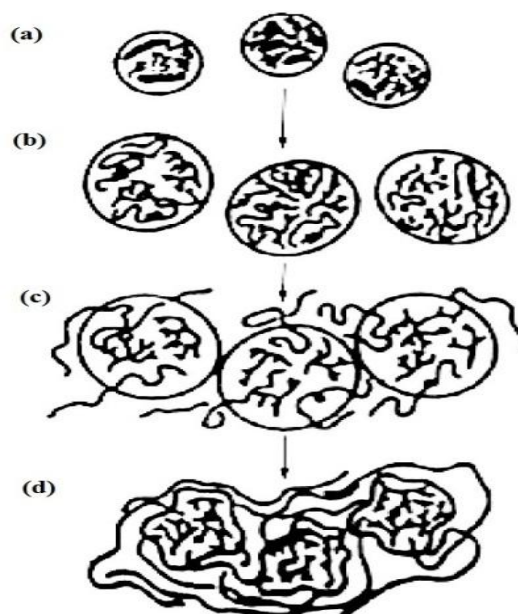
ramificaciones; su conformación es arborescente con un grado de polimerización entre  $3 \times 10^5$  y  $3 \times 10^6$  residuos de glucosa. Dentro del gránulo forman “clusters”.

En la harina de trigo el tamaño de los gránulos de almidón se distribuye en forma bimodal: gránulos esféricos con diámetros de hasta 10  $\mu\text{m}$ , y gránulos lenticulares de hasta 20  $\mu\text{m}$  (Karlsson y col., 1983; Moon y col., 1993). Al observarlos con un microscopio de luz polarizada exhiben birrefringencia con forma de cruz de Malta, que indica un arreglo radial de las moléculas de almidón en el gránulo alrededor del hilio, el centro biosintético (Jane, 2004).

El gránulo de almidón presenta una estructura semicristalina, consistente en zonas amorfas y cristalinas (20 – 40%) alternadas, donde las zonas amorfas son menos densas y están conformadas principalmente por la amilosa, mientras que las zonas cristalinas están formadas principalmente por dobles hélices de amilopectina.

En una suspensión de almidón nativo (Figura 1.3a) en exceso agua a temperatura ambiente, los gránulos de almidón pueden hincharse (Figura 1.3b), esto es, absorber parte del agua incrementando su tamaño un 10 – 30% (Dengate, 1984). Al calentar esta suspensión, ocurre un fenómeno irreversible conocido como gelatinización (Figura 1.3c y d), perdiéndose el orden molecular y por lo tanto, la birrefringencia. La gelatinización se inicia en las zonas amorfas donde los enlaces de hidrógeno son más lábiles permitiendo la entrada de agua al gránulo. Luego, ocurre la disociación de la doble hélice de moléculas de amilopectina, la fusión de las zonas cristalinas y la salida de moléculas de amilosa lo que ocasiona un incremento de la viscosidad de la suspensión.

La gelatinización de almidón de trigo en exceso de agua analizada por calorimetría diferencial de barrido (DSC), se presenta como una única endoterma entre 50 °C y 80 °C. Cuando el agua es limitante se observa un corrimiento del rango de temperatura de gelatinización a valores mayores y un desdoblamiento de la endoterma (Ghiasi, 1982). Si se continúa incrementando la temperatura o se realiza un



**Figura 1.3. Gelatinización de gránulos de almidón. a) Gránulos nativos, b) gránulos hinchados, c) gránulos gelatinizando, d) gránulos gelatinizados. (Lai-Kokini, 1991)**

esfuerzo de cizalla la estructura remanente del gránulo sigue dañándose y permitiendo la salida de más amilosa.

Cuando la pasta se enfría, ocurre la gelación de la amilosa, formándose una estructura de doble hélice entre las moléculas. El resultado es una matriz continua de amilosa donde se encuentran insertos gránulos de almidón gelatinizados, que contienen principalmente amilopectina. Este sistema se denomina gel de almidón.

Al prolongarse el almacenamiento del gel, la amilosa y la amilopectina pueden recrystalizar, fenómeno que se conoce como retrogradación del almidón, y que está relacionado con el envejecimiento de los panificados durante el almacenamiento. Este proceso ocurre en horas en el caso de la amilosa y en días a semanas para la amilopectina. La retrogradación de la amilopectina ocurre dentro de los gránulos gelatinizados o sus remanentes.

Durante el amasado el almidón absorbe cerca del 40% del agua (Stauffer, 1998) y actuaría como relleno en la matriz de la masa contribuyendo a aumentar su viscoelasticidad. Se ha propuesto que en la masa el almidón y las proteínas del gluten se encontrarían formando fases diferentes (Tolstoguzov, 1997).

Se llama almidón dañado al que presenta grietas o fisuras, producidas durante la molienda. Los gránulos dañados pueden absorber hasta 4 veces más agua que los gránulos intactos. La enzima  $\alpha$ -amilasa puede actuar sobre ellos liberando glucosa que será sustrato para las levaduras (Howitt y col., 2003; Hajsělová, 2003; Stauffer, 1998). En la harina de trigo podemos encontrar hasta un 15% de gránulos de almidón dañados.

Durante el horneado, el almidón cumple varios papeles. Por un lado ocurre la gelatinización, lo que fija la estructura alveolar de la miga y determina el volumen alcanzado por el pan (Eliasson, 2003). En el almacenamiento, el almidón retrograda conduciendo al endurecimiento de la miga (Pateras, 1998). Por otra parte, el almidón contribuye al desarrollo del color de la corteza, uno de los primeros parámetros de calidad percibidos por el consumidor, debido a que comprende la apariencia externa del producto. El color característico de un pan horneado se genera por pardeamiento no enzimático producto de reacciones de Maillard: una serie de complejas reacciones que involucran a hidratos de carbono reductores, tales como glucosa y otras dextrinas derivadas de la hidrólisis del almidón, y a proteínas que presentan aminoácidos con restos nitrogenados en sus cadenas laterales, como la lisina. Las reacciones de Maillard se ven notablemente favorecidas a temperaturas cercanas a los 160 °C y a bajas actividades acuosas, condiciones que se generan en la superficie de la masa durante el horneado debido al frente de deshidratación provocado por la acción directa del calor. Es por esta razón que la corteza exhibe su característico color pardo

mientras que la miga, al no alcanzar temperaturas tan altas debido a su mayor contenido de agua, conserva el color de la masa (Edwards, 2007).

## 1.2. Alimentos funcionales

Tanto los países desarrollados como los que están en vías de desarrollo presentan elevadas tasas de prevalencia de enfermedades crónicas no transmisibles, tales como cardiovasculares, hipertensión, cáncer, obesidad y diabetes (OMS 2002, 2006). En las últimas décadas se ha incrementado la prevalencia de la obesidad, considerándose la enfermedad crónica no transmisible más frecuente del mundo (Consenso, 2005). Éste incremento de la obesidad ha ocasionado una mayor incidencia de complicaciones asociadas como la diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico, tanto en niños como en adultos. Se ha atribuido el incremento de la obesidad a los cambios producidos a partir de la década del 80 en la dieta de la población, vinculados al aumento del consumo de grasas saturadas y de alimentos ricos en azúcares refinados, y la disminución de la realización de actividad física (Harwicz y Kovalskys, 2009).

Sin embargo, también se ha incrementado la demanda por parte de la población de productos con contenido reducido en calorías, grasas y azúcares. El incremento del consumo de estos productos se asocia a los problemas de sobrepeso, al mayor conocimiento de los efectos adversos del consumo excesivo de grasas y azúcares, al incremento de las enfermedades relacionadas con una ingesta excesiva de éstos y a una mayor preocupación por parte de los consumidores por su imagen y salud. Dado que la causa principal de los problemas de sobrepeso es la ingesta excesiva de calorías, la posibilidad de ingerir alimentos bajos en calorías, similares a los habituales, podría ayudar a mantener dietas hipocalóricas y por lo tanto contribuiría a reducir los problemas de sobrepeso (Gómez y col. 2009).

En los últimos años se ha observado un incremento en el consumo de alimentos considerados saludables. En un aspecto superador, los llamados “alimentos funcionales” son aquellos que no sólo proveen nutrientes básicos de la alimentación sana, sino que además pueden promover diferentes beneficios para la salud y/o reducir del riesgo de desarrollar enfermedades crónicas en los individuos sanos que los consumen. Cabe destacar que bajo la definición de alimento funcional entra en consideración que los mismos deben ser capaces de integrarse a la alimentación

cotidiana de los consumidores, complementando una dieta sana y equilibrada (Juárez Iglesias, 2010).

En la categoría de alimentos funcionales se encuentran los alimentos llamados probióticos, prebióticos y simbióticos, así como también los que contienen ingredientes como péptidos con actividad biológica y los que en su composición presentan ácidos grasos saludables en proporciones adecuadas, entre otros. Algunos de estos ingredientes se enumeran en la Tabla 1.4 mostrando además el efecto biológico de los mismos.

**Tabla 1.4. Ingredientes funcionales y potencial actividad biológica (adaptada de Juárez y Mariné, 2008).**

Ingrediente	Actividad biológica
Péptidos	Efecto beneficioso frente a la hipertensión
Isoflavonas (soja)	Disminución del riesgo de ciertos tipos de cáncer Reducción de síntomas de menopausia
Minerales	Retraso en la osteoporosis
Ácidos poliinsaturados	Reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares
Esteroles de plantas	Inhibición de la absorción de colesterol
Flavonoides, carotenoides, vitaminas antioxidantes (A, E, C)	Protección frente a ciertos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares
Probióticos/prebióticos	Mejora de la flora intestinal y del estado inmunológico
Fibra alimentaria	Regulación de funciones intestinales y colesterolemia

Se considera también en la categoría de alimentos funcionales a aquellos que carecen de componentes naturales que pueden ser perjudiciales en consumidores con ciertas patologías crónicas como hipertensión, diabetes mellitus, gastritis, etc.

Las posibilidades para la elaboración de alimentos funcionales son variadas e incluyen la incorporación de estos ingredientes con probada actividad biológica a un alimento convencional. También pueden obtenerse mediante la eliminación de constituyentes naturales antinutritivos o indeseados, o incluso por la sustitución de estos componentes por otros con efecto positivo para la salud. Otra posibilidad es la fortificación con componentes naturales benéficos, o el aumento de la biodisponibilidad. Teniendo en cuenta todas estas posibilidades y combinaciones de ellas, entre otras, es claro que la gama de productos es amplia y con un gran potencial de comercialización y consumo.

### 1.3. Panificados saludables

Dado que el consumo de pan se encuentra ampliamente arraigado en nuestro país, constituye un muy buen vehículo para introducir un ingrediente funcional. De este modo, es posible aumentar la capacidad funcional del pan incorporando ingredientes beneficiosos para la salud tales como almidón resistente, proteínas y péptidos, compuestos bioactivos y antioxidantes, entre otros. También puede constituirse en vehículo de nutrientes a través del proceso de fortificación (Araya y Alviña, 2009). En la Argentina, el enriquecimiento de la harina por ley 25.630 (2002) cumple esta función al obligar a la incorporación de hierro, ácido fólico, y vitaminas B1, B2 y niacina a ésta materia prima.

Los ingredientes funcionales más habituales en panificados industriales en nuestro país se muestran en la Tabla 1.5. A partir de la misma surge que los ingredientes funcionales que más se están utilizando son las semillas mientras que no se ha incorporado en gran medida la utilización de harinas de distintos orígenes en los panificados industriales como podrían ser las de cultivos andinos. Según la información provista por los fabricantes, el aporte de fibra de una porción de pan de 50 g oscila entre los 1,2 y 4,3 g y las kilocalorías aportadas varían entre 106 y 135, dependiendo de la formulación.

**Tabla 1.5. Ingredientes funcionales utilizados en la República Argentina\***

Harinas	Fuente de Fibra	Semillas**	Fortificación con minerales y vitaminas	Leche
		Lino	Fe	
		Chía	Ca	
Harina de trigo (enriquecida)	Salvado de trigo	Amapola	Zn	Leche entera en polvo descremada
Harina integral	Fibra de	Girasol	P	
Harina de centeno	avena	Sésamo	Mg	
		Germen de trigo	Cu	
			K	
			Vitamina D	

\* Información obtenida a partir de la revisión de los productos ofrecidos por las mayores empresas productoras de pan industrializado de nuestro país

\*\* Semillas: aportan ácidos grasos insaturados, minerales, fibras.

Los procesos culinarios y tecnológicos que se aplican durante la elaboración del pan destruyen parcialmente los gránulos en que se presenta el almidón nativo, dando origen a lo que se conoce como almidón gelatinizado (Bello-Pérez y col., 2006). Cuando éste se consume las amilasas digestivas lo degradan, y sus productos son rápidamente absorbidos en el intestino. Este proceso conlleva la elevación brusca y rápida de la glicemia, con el consecuente aumento de los niveles de insulina, hormona encargada de la homeostasis de la glucosa (FAO/WHO, 1998; Araya, 2003).

Las respuestas rápidas mencionadas se consideran dañinas, ya que aumentan el riesgo de desarrollar resistencia a la insulina y, consecuentemente diabetes tipo 2, en la medida que se repiten a lo largo de la vida (Augustin y col., 2002; Brand-Miller, 2003). Sin embargo, existen almidones de digestión lenta que producen curvas glicémicas aplanadas y sostenidas en el tiempo, por lo que la velocidad de digestión enzimática de los almidones a nivel intestinal determina su característica saludable, evaluada a través de su efecto glicémico e insulínico.

Los almidones contienen habitualmente una proporción que resiste la hidrólisis enzimática en el intestino, por lo que se le denomina almidón resistente (AR) (Ciacco y col., 2001). La presencia de estos almidones en concentraciones considerables disminuye la cantidad que es capaz de hidrolizarse y absorberse, de manera que la respuesta glicémica e insulínica sea leve. El índice glicémico (IG) fue propuesto por Jenkins y col. (1981) como una herramienta para clasificar a los alimentos altos en carbohidratos según su potencialidad para elevar la glicemia. Entre los cereales y sus derivados, se pueden distinguir aquellos con efecto glicémico bajo (menor a 45%, considerado saludable) como la avena y las pastas cocidas *al dente* y los de efecto glicémico alto (mayor a 70%, considerado poco saludable) como el pan blanco, pan francés, pan de molde, etc. (Hare-Bruun y col., 2006; Levitan y col., 2007; Foster-Powell y col., 2002; Wolever y col., 2003). Los alimentos de alto IG, como el pan, representan un riesgo para el desarrollo de obesidad y diabetes y, de manera indirecta, para las enfermedades cardiovasculares (Pi-Sunyer, 2002; Sheard y col., 2004; Ebbeling y col., 2005; Qi y Hu, 2007). Por lo tanto, IG es un indicador de la calidad saludable de los alimentos respecto a sus hidratos de carbono.

La determinación del IG se realiza *in-vivo* midiendo el contenido de glucosa en sangre en función del tiempo (1,5 a 3 horas) luego del consumo de 50 g de carbohidratos del alimento estudiado y se lo compara con la respuesta producida por el consumo de 50 g de carbohidratos de un alimento de referencia. Se calcula como la relación entre el área bajo la curva del alimento problema y la del estándar, y se expresa como porcentaje (FAO/WHO, 1998). Como patrones pueden empararse la glucosa y el pan blanco debido a que ambos producen curvas glicémicas altas y

amplias. Se considera que ambos presentan valores de IG = 100 (Mathers y Wolever, 2002). Debido a la complejidad experimental de esta determinación se han desarrollado métodos *in-vitro* para estimar el IG, de este modo se cuenta con procedimientos más rápidos, sobre todo en los casos que el estudio se encuentra centrado en el desarrollo de un producto (Granfeldt y col., 1992, Goñi y col., 1997, Englyst y col., 1999, Araya y col., 2002).

En consecuencia, se requiere de alimentos que contengan factores de protección, como por ejemplo, un IG bajo, que a su vez estén incorporados plenamente a los hábitos alimentarios de las poblaciones, de manera de impactar en los indicadores de salud. En este sentido, se han realizado diversos intentos para disminuir el IG del pan, sustituyendo en diferentes proporciones la harina de trigo por otra materia prima que aporte almidones de digestión lenta o almidones resistentes (AR), otorgándole la característica funcional, en la medida que esta modificación logre demostrar un beneficio para la salud (Chinachoti, 1995). Cabe destacar que el pan blanco contiene tan sólo alrededor de 1% de AR y cerca del 70% de sus almidones son de digestión rápida (Englyst y col., 1992).

### 1.3.1. Almidón resistente como ingrediente funcional en panificados

El componente mayoritario de la masa panaria es el almidón, polisacárido digerible cuyo consumo está limitado o no recomendado en casos específicos como diabetes y obesidad (Larrañaga y col., 1997). Por ello, el almidón resistente, definido como la suma del almidón y productos de degradación del mismo que resisten la digestión en el intestino delgado de individuos sanos (Asp, 1992), resulta un ingrediente que puede conferir funcionalidad al pan tradicional si se reemplaza parcialmente a la harina de trigo por éste. Esta estrategia permitiría obtener productos panificados de menor índice glucémico que podrían ser utilizados en regímenes especiales. Por otro lado, el AR es considerado como un ingrediente alimentario con un amplio espectro de efectos fisiológicos positivos, inclusive actuando como prebiótico (McClearly y Brown, 2004). Es así como una vez alcanzado el intestino grueso, el AR podría actuar como sustrato para la fermentación por la microflora intestinal, dando lugar a la formación de dióxido de carbono, metano, hidrogeno, ácidos orgánicos y ácidos grasos de cadena corta (SCFA) (Nugent, 2005). Estos últimos, ejercerían efectos beneficiosos sobre los colonocitos de la mucosa intestinal

(Topping y col., 2003). Así mismo, el empleo de almidón resistente permitiría obtener productos de menor valor calórico.

Los efectos fisiológicos generales y específicos implicados en el consumo de alimentos con AR se detallan en la Tabla 1.6.

**Tabla 1.6. Efectos fisiológicos asociados al consumo de AR (adaptado de Brown, 2004)**

Evidencia fisiológica general	Efecto fisiológico específico
Respuesta glicémica reducida	Respuesta glicémica post-prandial más lenta Respuesta insulínica post-prandial más lenta
Energía reducida	Menos calorías disponibles Metabolismo lipídico aumentado
Mejora en la salud del intestino	Sustrato fermentable (controlado) Aumento de la producción de SCFA en el colon Niveles reducidos de ácidos biliares secundarios Niveles reducidos del amonio fecal Aumento del bolo fecal Reducción del tiempo de tránsito fecal Tolerancia alta
Prebiótico	Aumento de la población de bifidobacterias colónicas y lactobacilos Disminución de la población de patógenos Interacciones sinérgicas potenciadas con otros probióticos
Aumenta la viabilidad de probióticos	Ayuda a mantener la viabilidad de bacterias probióticas durante el procesamiento y consumo del alimento
Aumento de absorción de nutrientes	Absorción aumentada de minerales, como calcio
Potencial para la protección del cáncer de intestino	Aumento de la producción de butirato Aumento del índice apoptótico Disminución de los niveles de compuestos citotóxicos del colon
Interacción sinérgica con otros compuestos alimentarios	Fibras alimentarias Proteínas Lípidos

El almidón resistente se clasifica en cuatro subtipos: AR1-AR4 (Brown, 2004):

- El almidón resistente tipo 1 (AR1) es el almidón que se encuentra físicamente protegido por ejemplo, por las paredes celulares en granos de cereales o en tubérculos;
- El tipo 2 (AR2) es almidón nativo que debe su resistencia a la digestión a la estructura cristalina del gránulo (Tipo B) por ejemplo el presente en banana verde. Se debe tener en cuenta que la propiedad de éstos gránulos



de no ser digeridos puede alterarse durante la cocción. El almidón de maíz rico en amilosa es el único que mantiene la estructura del gránulo en las condiciones de cocción de muchos alimentos y por lo tanto mantiene el nivel de almidón resistente y fibra alimentaria;

- El almidón resistente tipo 3 (AR3) se forma a través del proceso conocido como retrogradación. Durante el enfriamiento de almidón que se ha sometido a temperaturas por encima de la temperatura de gelatinización ocurre la asociación de las cadenas de amilopectina dando lugar a una estructura cristalina resistente a la hidrólisis. En el pan la cantidad formada puede variar dependiendo de las condiciones de proceso utilizadas;
- El almidón resistente tipo 4 (AR4) es almidón modificado químicamente de forma tal que no se permite la acción de las enzimas digestivas (Nugent, 2005).

Desde el punto de vista tecnológico el reemplazo de la harina de trigo constituye una dificultad si se quieren mantener los atributos de calidad, ya que se está disminuyendo la proporción de proteínas de gluten. Estas proteínas (gliadinas y gluteninas) son las responsables de formar, en presencia de agua y con aporte de la energía mecánica del amasado, una red viscoelástica capaz de expandirse y retener el CO<sub>2</sub> formado durante la fermentación. Las características de calidad de los panes (buen volumen, miga aireada y esponjosa) dependen de la calidad y cantidad de gluten por lo que el reemplazo de harina de trigo por harinas de otros orígenes o almidones conduce generalmente a panes de menor volumen y migas de pobres características texturales. En estos casos, el agregado de mejoradores de panificación puede resultar una opción adecuada para compensar la pérdida de calidad (Stauffer 1990).

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## 2.1. Hipótesis

El presente plan se basa en la posibilidad de formular matrices panarias con un menor contenido de almidón disponible (menor índice glucémico) a partir de mezclas de almidón resistente y harina de trigo, manteniendo una buena calidad tanto del punto de vista tecnológico como sensorial. Se espera que los resultados obtenidos permitan optimizar la aplicación del almidón resistente en masas panarias con el objeto de lograr productos panificados funcionales.

## 2.2. Objetivos

### 2.2.1. Objetivo general

Desarrollar productos panificados con atributos de calidad aceptables para el consumidor a partir de mezclas de harina de trigo y almidón resistente.

### 2.2.2. Objetivos específicos

Evaluar el efecto de la incorporación de almidón resistente en las características reológicas y las transiciones térmicas (gelatinización, retrogradación) de la masa panaria.

Analizar el efecto de la incorporación de almidón resistente en la microestructura de la masa, particularmente en la conformación de la red de gluten.

Evaluar el efecto de la incorporación de almidón resistente en las características sensoriales y la calidad del producto final.

Estimar la digestibilidad del almidón en el producto final a través de ensayos *in-vitro*.

# **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1. Materiales

#### 3.1.1. Materias primas

En la formulación de las masas panarias se empleó harina de trigo 000 comercial (Molino Campodónico S.A., Argentina), almidón de trigo resistente modificado químicamente (AR) de calidad alimentaria (Fibersym RW, MGP, Estados Unidos), sal de mesa común (Celusal, Argentina), levadura fresca comercial (Calsa, Argentina) y agua destilada.

Para evaluar la calidad de la harina, se tomaron en cuenta los parámetros farinográficos de la misma. La harina utilizada para los ensayos presentó las características de composición y farinográficas que se enumeran en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1. Composición y parámetros farinográficos de harina de trigo**

Composición	Harina de trigo
Humedad (g/100 g muestra)	11,3 ± 0,2
Proteínas (g/100 g muestra)	11,92 ± 0,03
Cenizas (g/100 g muestra)	Máximo de 0,65*
Parámetros farinográficos **	
Absorción (g/100 g muestra)	58,9
Tiempo de desarrollo (min)	9,7
Estabilidad (min)	19,1
Aflojamiento (UF)	33

\* Según Código Alimentario Argentino, Art. 661 (Res. 167, 26.1.82)

\*\* Provistos por el molino

En la Tabla 3.2 se muestran los parámetros alveográficos de la harina utilizada obtenidos en el alveógrafo de Chopin y provistos por el molino. Los mismos amplían y complementan las características de calidad de la harina.

**Tabla 3.2. Parámetros alveográficos de la harina**

Parámetros alveográficos*	
Tenacidad (P)	91 mmH <sub>2</sub> O
Extensibilidad (L)	109 mm
Índice de Hinchamiento (G)	23,2
Trabajo de Deformación (W)	3,38.10 <sup>-4</sup> J
Equilibrio (P/L)	0,83
Índice de Elasticidad (Ie)	61,6%
W (40)	161 J

\* Provistos por el molino

Estos datos muestran que la harina utilizada posee las características farinográficas y alveográficas adecuadas para panificar (Pantanelli, 2009).

El almidón resistente utilizado es de tipo 4. Este tipo de almidón resistente se obtiene por modificación química. Se induce el entrecruzamiento del almidón mediante trimetafosfato de sodio (agente de entrecruzamiento) con pequeñas cantidades de tripolifosfato de sodio (agente de sustitución) unidos covalentemente a su estructura. El nivel de residuos es menor al 0,4% de fósforo. Sin embargo, el grado de entrecruzamiento generado por los mismos en la estructura del almidón es elevado. En consecuencia, el hinchamiento (hidratación) del gránulo tratado térmicamente es limitado, alcanzando los 2,8 g/g a 95 °C. Asimismo, su solubilidad en agua a 95 °C es de 0,5%. Esto evita la acción de las enzimas hidrolíticas, dado el impedimento estérico, y es la causa de la resistencia a la digestión. Además, los gránulos de almidón resistente son idénticos a los de almidón nativo cuando son observados por microscopía electrónica de barrido, y dan los mismos patrones de tipo A por difracción de rayos X. Por otro lado, provee fibra dietética en un mínimo del 85% (base seca), utilizando el método AOAC 991.43, la cual es principalmente insoluble dado el grado de entrecruzamiento (MGP, 2011).

### 3.1.2. Preparación de las mezclas

A partir de los ensayos farinográficos se confeccionaron 4 formulaciones de masas panarias con harina de trigo, AR, agua y sal, para realizar tanto ensayos en

masa como en productos panificados. Las mismas se prepararon según las proporciones que se especifican en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3. Formulación de las mezclas harina de trigo-AR**

	Control	AR10	AR20	AR30
Harina de Trigo (g)	100	90	80	70
Almidón Resistente (g)	0	10	20	30
Sal (g)	2	2	2	2
Levadura (g)	3	3	3	3

Para los ensayos reológicos y microestructurales no se incluyó levadura en la formulación, ya que la fermentación produciría cambios en la matriz durante la ejecución de los mismos. El agua se adicionó en la formulación según la absorción farinográfica para cada mezcla.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Caracterización de harina y mezclas a través de ensayos farinográficos

Para evaluar la aptitud panadera de las mezclas formuladas (Tabla 3.1) se emplearon ensayos farinográficos (Norma IRAM 15855), los cuales se realizaron en un farinógrafo de Brabender de 300 g de capacidad (Duisburg, Alemania). En este tipo de ensayos, las mezclas son sometidas a esfuerzos con paletas amasadoras en forma de Z que simulan el proceso de amasado rotando en un eje horizontal. El torque requerido para mezclar la muestra y los cambios que se producen en la misma durante el amasado son cuantificados por el farinógrafo y en base a estos datos se obtiene un farinograma, como el mostrado en la Figura 3.1, a partir del cual se extraen los parámetros farinográficos característicos de cada mezcla. Los parámetros farinográficos sirven para evaluar el comportamiento que tendrá una formulación para masa panaria durante los procesos de panificación (Bourne, 2002).

La absorción de agua (A) se calculó en un pre-ensayo agregando diferentes volúmenes de agua y observando el comportamiento de la masa en el farinógrafo hasta optimizar su valor (consistencia de 500 Unidades Farinográficas, UF). Con este

valor de A fueron realizados los farinogramas, a partir de los cuales se obtuvieron los siguientes parámetros: tiempo de desarrollo (B), estabilidad (D) y ablandamiento (F).

- tiempo de desarrollo (B): se calculó como el tiempo, en minutos, necesario para alcanzar el pico de máxima consistencia en el farinograma.
- estabilidad (D): tiempo, en minutos, que transcurre entre que la masa supera las 500 UF y vuelve a estar por debajo de éste valor.
- ablandamiento (F): se calculó como la diferencia en UF que hay entre el centro de la curva en el tiempo de desarrollo y el centro de la curva 12 minutos después.

El tiempo de desarrollo y la estabilidad están relacionados con la tolerancia de la harina a los diversos pasos de panificación. Asimismo, el farinograma permite evaluar la incidencia de otros componentes agregados a la masa como aditivos o en el caso del presente trabajo, el efecto de la incorporación de almidón resistente.

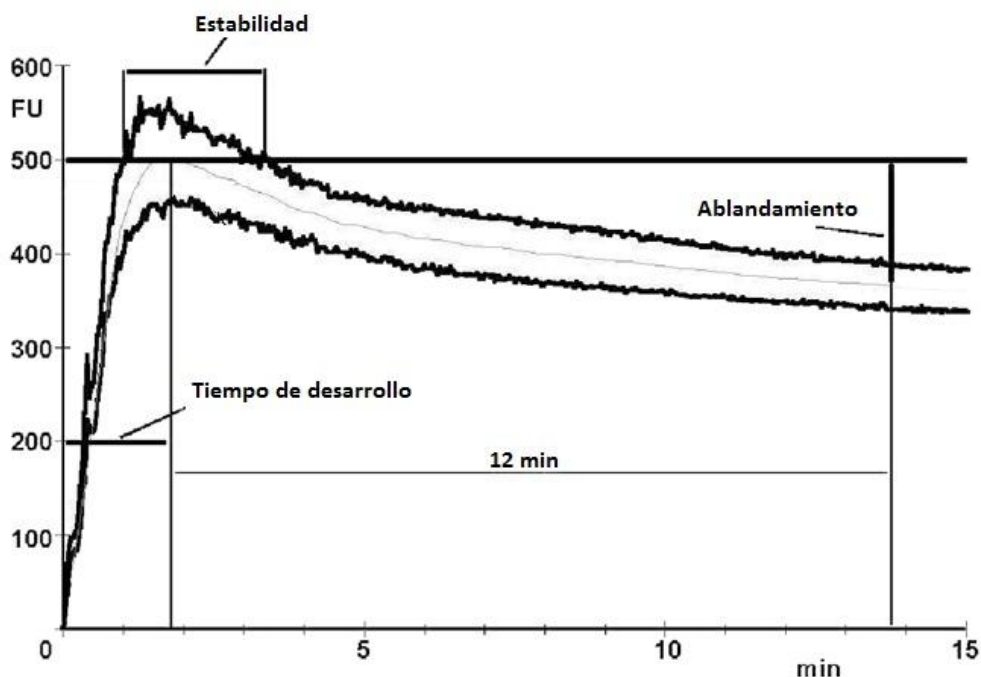


Figura 3.1. Farinograma y parámetros farinográficos (adaptada de [http://www.cwbrabender.com/Farinograph-AT.html#!prettyPhoto\[light\\_rounded\]/1/](http://www.cwbrabender.com/Farinograph-AT.html#!prettyPhoto[light_rounded]/1/)).

### 3.2.2. Preparación de las masas para ensayos reológicos

En el proceso de obtención de masa panaria los ingredientes: harina de trigo, AR y sal, se colocaron en una amasadora planetaria (Kenwood, Italia) y se mezclaron en seco durante un minuto a la menor velocidad (52 rpm). Se procedió entonces con el



agregado del agua, la cual se adicionó durante el primer minuto de amasado, también a la velocidad más baja. Luego del primer minuto se aumentó la velocidad a la segunda posición (89 rpm) y se continuó con el amasado según el parámetro farinográfico B para cada mezcla.

Una vez finalizado el tiempo de amasado, se procedió a sacar la masa de la amasadora y se la colocó en una base de acrílico cubierta con film para su reposo durante 10 minutos, tiempo en el cual se logra la relajación de la masa para los ensayos subsiguientes.

### 3.2.3. Ensayos reológicos fundamentales y empíricos en masa

#### 3.2.3.1. Ensayos de reometría oscilatoria

La reología tiene muchas aplicaciones en el campo de la aceptabilidad, procesamiento y manipulación de los alimentos. Muchas operaciones durante el procesamiento dependen fuertemente de las características reológicas del producto, y tienen gran influencia en las propiedades del producto final. En este caso, la reología de la masa de pan es de gran importancia para la obtención de productos de buena calidad panadera (Bourne, 2002).

Los ensayos de reología oscilatoria constituyen una excelente herramienta en la caracterización de materiales viscoelásticos, es decir, aquellos que no son ni sólidos ni líquidos en sentido estricto sino que presentan características intermedias. La reología oscilatoria permite la caracterización de estos materiales a través de la medición de la respuesta dada por la muestra (deformación,  $\gamma$ ) ante la aplicación de esfuerzos de corte (cizallamiento,  $\sigma$ ) armónicos variables, generalmente sinusoidales. El módulo elástico o de almacenamiento ( $G'$ ) representa a la componente elástica (comportamiento como sólido ideal) de la respuesta del material al esfuerzo aplicado. El módulo viscoso o de pérdida ( $G''$ ) representa, en cambio, a la componente viscosa (comportamiento como líquido ideal) de esa respuesta. Ambos módulos son dependientes de la frecuencia ( $\omega$ ) de los esfuerzos de corte aplicados y se relacionan entre sí a través de otros dos parámetros: el módulo complejo ( $G^*$ ) y la tangente del ángulo de desfasaje ( $\tan \delta$ ).

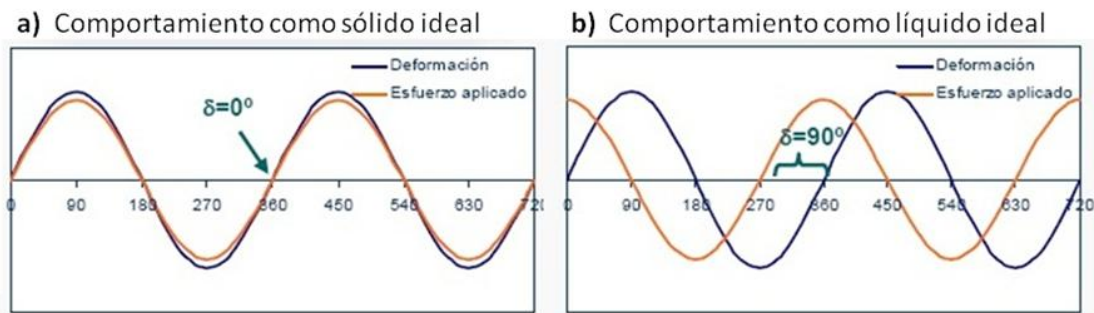
$$G' = (\sigma_0 / \gamma_0) \cdot \cos \delta \quad \text{EC. 3.1}$$

$$G'' = (\sigma_0 / \gamma_0) \cdot \sin \delta \quad \text{EC. 3.2}$$

$$G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad \text{EC. 3.3}$$

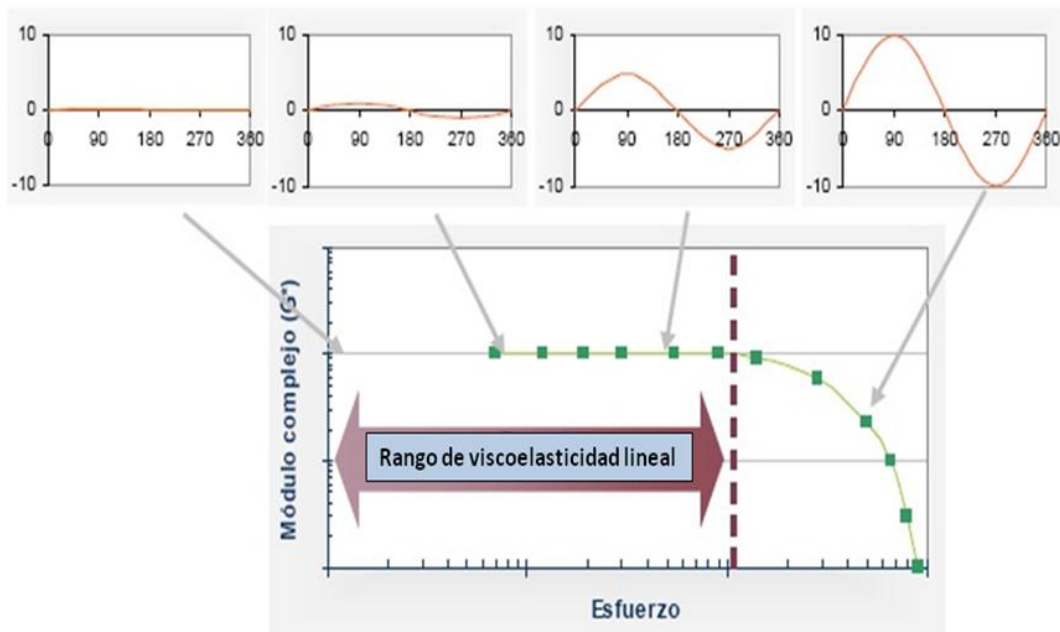
$$\tan \delta = G'' / G' \quad \text{EC. 3.4}$$

donde  $\sigma_0$  es el esfuerzo máximo aplicado,  $\gamma_0$  es la deformación máxima alcanzada y  $\delta$  es el ángulo de desfase entre la respuesta y la perturbación aplicada (Figura 3.2).



**Figura 3.2. Representación de los ángulos de desfase ( $\delta$ ) para a) un sólido ideal y b) un líquido ideal (Apuntes de cátedra: Propiedades físicas y químicas de alimentos II).**

Quando estas deformaciones son de pequeña amplitud, la matriz viscoelástica del alimento mantiene su integridad microestructural. Si las deformaciones aplicadas son de mayor amplitud, puede producirse una ruptura de la matriz alimentaria. El rango de amplitudes de deformación en el cual la integridad de la microestructura se mantiene intacta se denomina rango de viscoelasticidad lineal, ya que la respuesta del material a las variaciones no depende de la magnitud de la deformación aplicada (Steffe, 1996).



**Figura 3.3. Esquema de un barrido de esfuerzo para determinar rango de viscoelasticidad lineal donde se muestran diferentes intensidades de esfuerzo aplicado (arriba) y la respuesta del material (módulo complejo,  $G^*$ , abajo) (Apuntes de cátedra: Propiedades físicas y químicas de alimentos II).**

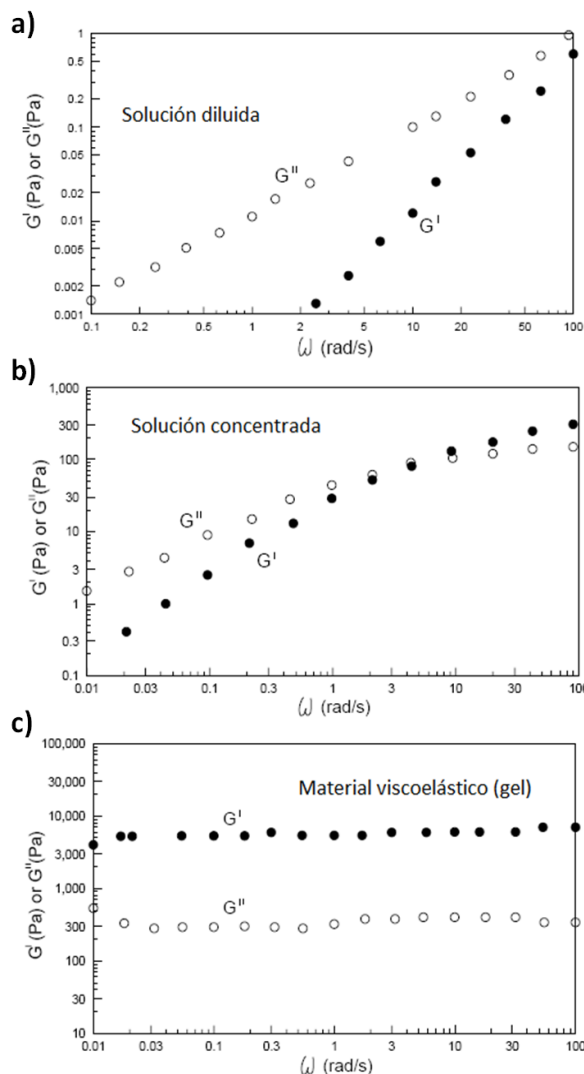
Cuando se aplica a las muestras un esfuerzo de corte de amplitud constante pero se varía la frecuencia de oscilación, pueden obtenerse espectros mecánicos (Figura 3.3) que muestran cómo es el comportamiento del material, a través de los módulos elástico y viscoso, en función de la frecuencia de oscilación.

Diferentes materiales presentan distintos tipos de espectros mecánicos dependiendo de las contribuciones elásticas y viscosas que el material presente en la deformación. En soluciones diluidas de hidrocoloides, el aporte viscoso es predominante y el comportamiento es aproximado al de un líquido ideal (Figura 3.4a).

En soluciones de hidrocoloides más concentradas, se observa a bajas

frecuencias una elevada contribución viscosa, por lo que es capaz de fluir. Sin embargo, a frecuencias de cizallamiento mayores, las grandes macromoléculas no son capaces de acomodarse a las rápidas variaciones durante la deformación, el aporte elástico aumenta y el material pierde fluidez (Figura 3.4b).

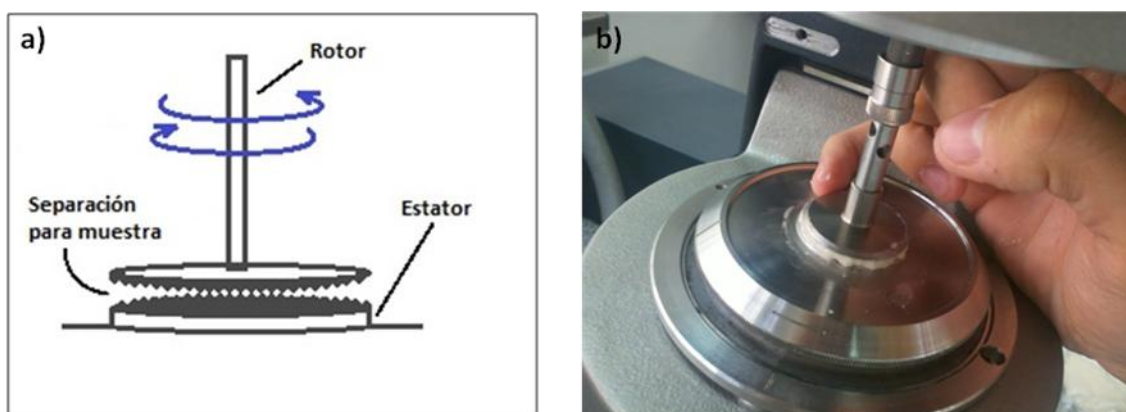
Algunos materiales, en cambio, muestran una predominancia del aporte elástico sobre el aporte viscoso a todas las frecuencias de esfuerzo aplicado, aproximándose más al comportamiento de un sólido ideal. Ambos módulos muestran una baja dependencia con la frecuencia de la deformación. Materiales de este tipo se denominan geles autoportantes y no son capaces de fluir (Figura 3.4c) (Steffe, 1996).



**Figura 3.4. Espectros mecánicos típicos de a) una solución diluida de hidrocoloide, b) una solución concentrada de hidrocoloide, c) un material viscoelástico (gel) (Adaptada de Ross-Murphy, 1988).**

Para la realización de estos ensayos se utilizó un reómetro Haake RS 600 (Thermo Science, Alemania) equipado con un sensor de platos paralelos aserrados con una separación de 1,5 mm (Figura 3.5a). Se realizaron barridos de esfuerzo de discos de masa de 3,0 cm de diámetro y a una frecuencia de 1 Hz para determinar el rango de viscoelasticidad lineal y barridos de frecuencia (0,005 a 100 Hz) a un esfuerzo de 5 Pa, ambos a 25 °C para obtener los espectros mecánicos. En todos los casos se utilizó una capa de vaselina para evitar la deshidratación de los discos de masa durante el transcurso del ensayo (Figura 3.5b). Los parámetros determinados fueron  $G'$ ,  $G''$  y  $\tan \delta$ .

Se evaluaron los módulos  $G'$ ,  $G''$  y  $\tan \delta$  a 1 Hz y se compararon sus valores entre las distintas muestras utilizando el programa estadístico Origin 8 SR0 v8.0725 (EEUU).



**Figura 3.5. a) Esquema de los sensores. b) Aplicación de vaselina al disco de masa colocado entre los sensores del reómetro Haake RS 600.**

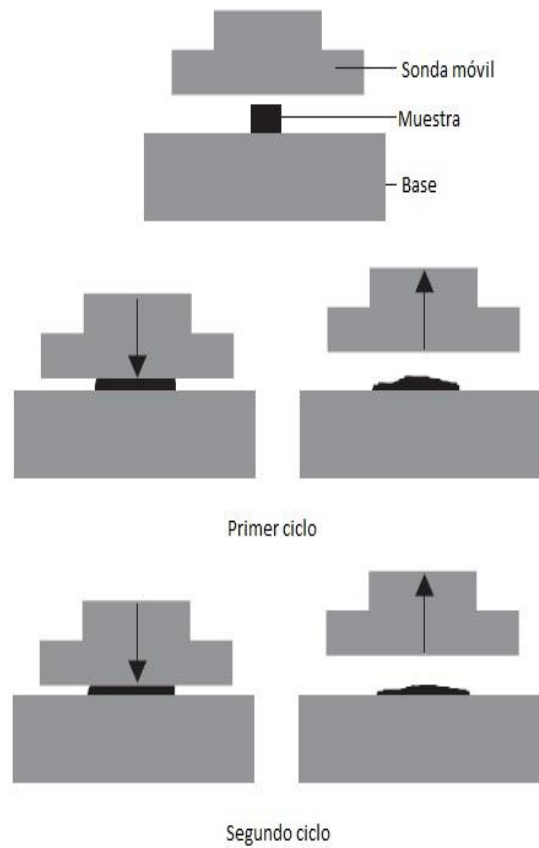
### 3.2.3.2. Análisis del perfil de textura (TPA)

El análisis del perfil de textura (TPA) es un ensayo imitativo de la masticación y permite obtener parámetros texturales empíricos que pueden correlacionarse con las características sensoriales del producto durante su deglución. Por su naturaleza empírica, estos ensayos deben realizarse cuidando que las condiciones sean lo más similares posibles para poder correlacionar y comparar los parámetros obtenidos.

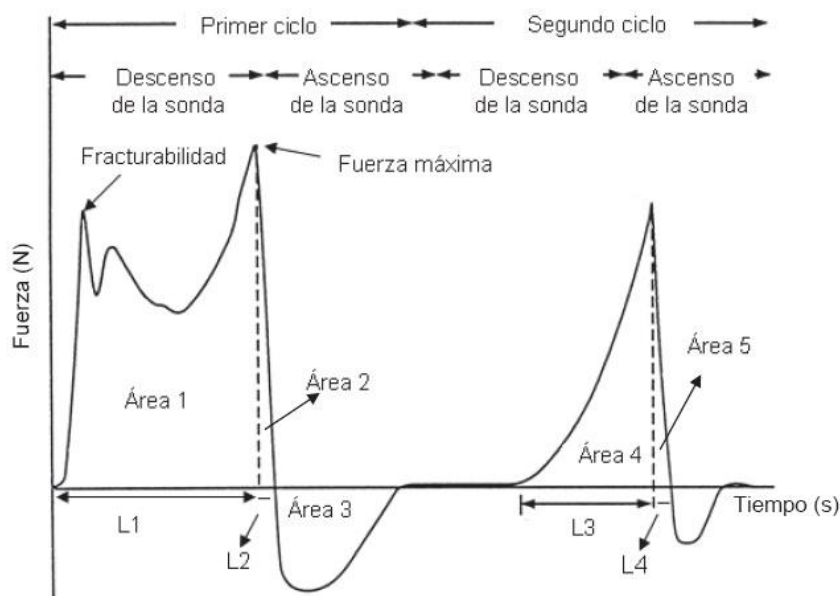
El ensayo consta de dos ciclos de compresión y descompresión de una muestra del tamaño de un bocado, utilizando una sonda circular plana (Figura 3.6). El equipo registra el esfuerzo necesario para los procesos de compresión y

descompresión de la muestra (Bourne, 2002). Si todas las muestras medidas presentan las mismas dimensiones, es posible graficar en lugar del esfuerzo (Fuerza/área) en función del tiempo del ensayo, a la fuerza en función del mismo obteniéndose el perfil de textura de la muestra estudiada (Figura 3.7).

Con el empleo de un texturómetro TA.XT2i (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido) se realizaron ensayos de TPA de masa, en el cual discos de 3,0 cm de diámetro y 1 cm de espesor se comprimieron hasta un 40% de su altura original. A partir de los perfiles de textura obtenidos se determinaron los parámetros: dureza (pico de fuerza máxima), adhesividad (área 3), cohesividad (área 4 + área 5 / área 1 + área 2), consistencia (área 1 + área 2 + área 4 + área 5), elasticidad ( $L3 / L1$ ), resiliencia ( $\text{área } 2 / \text{área } 1$ ) y gomosidad (dureza \* cohesividad) de la masa.



**Figura 3.6. Esquema de los ciclos de compresión y descompresión de una muestra para los ensayos de TPA (Adaptado de Bourne, 2002)**



**Figura 3.7. Perfil de Textura típico (Adaptado de Bourne, 2002)**

### 3.2.4. Análisis microestructural

#### 3.2.4.1. Preparación de la masa para análisis microestructural

Se prepararon las masas de cada muestra en un microfarinógrafo de Brabender (Duisburg, Alemania) de 10 g de capacidad. Para esto se utilizaron las proporciones de harina de trigo, AR y sal enumerados en la Tabla 3.3. Para cada mezcla harina de trigo-AR se empleó como agua de amasado el valor correspondiente a la absorción farinográfica de agua y se utilizó como tiempo de amasado al tiempo de desarrollo farinográfico. Todas las muestras se amasaron por duplicado.

#### 3.2.4.2. Análisis microestructural por microscopía confocal láser de barrido (CSLM)

La microscopía confocal láser de barrido (CSLM) es una técnica que permite obtener imágenes de la microestructura de la muestra minimizando la alteración de la misma durante su preparación. El principio de confocalidad permite eliminar la luz fluorescente proveniente de puntos que se encuentran fuera de foco mediante la utilización de diafragmas, logrando así mejorar la resolución y generando imágenes de muy buena calidad. El hecho de utilizar luz láser implica que la pequeña sección que se busca observar sea iluminada con gran intensidad aumentando notablemente la nitidez y el contraste. Se pueden obtener entonces imágenes limpias de cada plano focal en una muestra, y luego reconstruir e integrar estas secciones en una sola imagen tridimensional nítida. En la Figura 3.8 puede verse un esquema del camino óptico típico de un microscopio láser confocal.

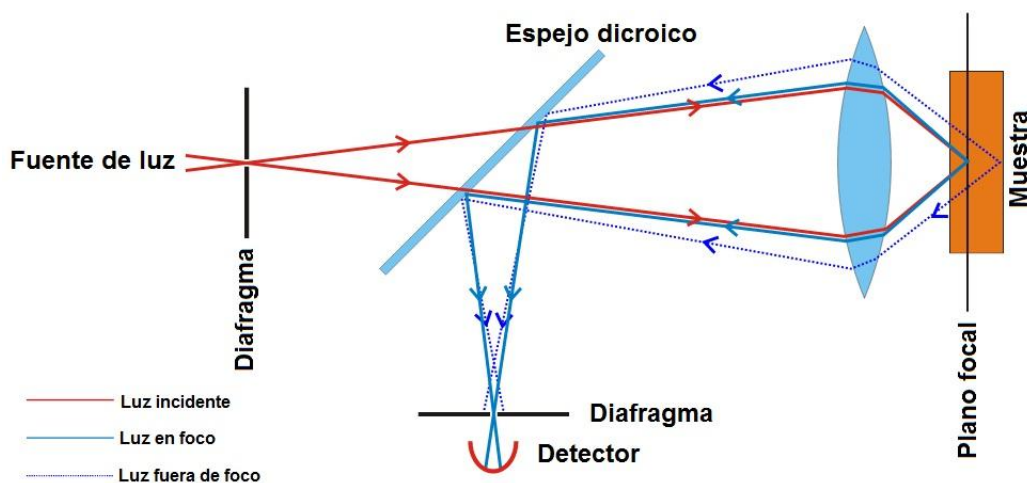


Figura 3.8. Camino óptico de un microscopio confocal (Adaptada de [es.wikipedia.org/wiki/Microscopio\\_confocal](https://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio_confocal))

Se prepararon extendidos sobre portaobjetos de las masas Control, AR10, AR20 y AR30 por duplicado. Se realizó una tinción no covalente impregnando los extendidos con una solución de rodamina B (Biopack) (0,001%) e isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma) (0,01%) en agua, dejando reposar en la oscuridad. Luego de una hora de reposo, los extendidos se observaron con un microscopio confocal invertido LEICA TCS SP5 equipado con láseres de argón y HeNe. Se tomaron micrografías de las masas a 10 X, 20 X (inmersión con agua) y 63 X (inmersión con aceite) con una resolución de 1024 x 1024 píxeles. Las longitudes de onda de excitación empleadas fueron 488 nm (para FITC) y 568 nm (para rodamina B) y las de emisión 518 nm y 625 nm para FITC y rodamina B, respectivamente. El análisis de las imágenes se realizó con el empleo del programa provisto por el fabricante del microscopio: LAS AF versión 2.2.1. build 4842 y con el programa ImageJ 1.43u, con el cual se obtuvieron los parámetros: dimensión fractal (D) y el porcentaje de proteína en la matriz (PMV). La dimensión fractal es un parámetro que nos otorga una medida del patrón de complejidad de la muestra estudiada. Cuanto mayor es el valor de D mayor es la complejidad de la matriz. Para el cálculo de D se puede emplear el método del conteo de cajas (Box-counting) utilizando el programa ImageJ. En este método, se cuenta el número de cajas (N) de lado r que son necesarias para cubrir el objeto del cual se desea determinar D y se repite este procedimiento para celdas de otro tamaño de lado r. Así se tiene que

$$N(r) = k \cdot r^{-D} \quad \text{EC. 3.5}$$

$$\log(N(r)) = \log k - D \log(r) \quad \text{EC. 3.6}$$

Donde D y k son constantes. Así al graficar  $\log(N)$  en función de  $\log(r)$  obtenemos de la pendiente el valor negativo de la dimensión fractal (D) de la muestra.

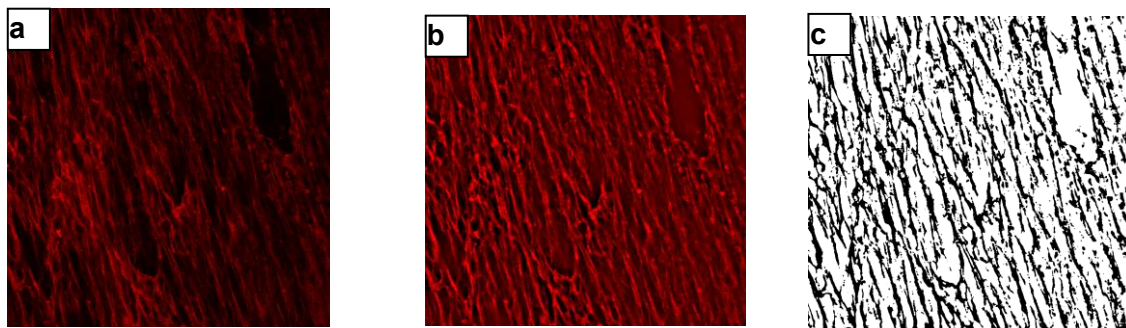
Por otro lado, el porcentaje de proteína de la matriz (PMV) se define como el porcentaje de área total que se encuentra ocupado por proteína. Matrices más abiertas presentarán menores valores de PMV.

#### 3.2.4.2.1. Procesamiento de imágenes para el cálculo de D y PMV

Para el cálculo de estos parámetros se empleó sólo el canal correspondiente a Rodamina B debido a que éstos dependen sólo de la matriz proteica. En la Figura 3.9 se muestra el procedimiento seguido. En primer lugar a las micrografías se les aplicó un filtro FFT para reducir artefactos y evitar así luego problemas debidos a sombras



presentes en las mismas (Walter, 2003). Posteriormente, la imagen así corregida se binarizó aplicando un umbral automático fijado por el programa ImageJ. A partir de la imagen binarizada se calcularon D y PMV.



**Figura 3.9. Procesamiento de imágenes para el cálculo de D y PMV. a) Micrografía original, canal correspondiente a rodamina B; b) Micrografía luego de aplicar el filtro FFT; c) Imagen binarizada.**

#### 3.2.4.3. Transiciones térmicas del almidón en masa panaria

Muchas matrices alimentarias presentan cambios microestructurales al ser tratadas térmicamente debido a que sus componentes (proteínas, polisacáridos y otras macromoléculas o estructuras complejas) ven afectadas las interacciones inter o intramoleculares que los estabilizan. Estos cambios pueden ser cuantificados mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC), y brindan información acerca de la microestructura de la matriz en estudio.

Las transiciones térmicas pueden clasificarse en exotérmicas (cuando liberan calor durante la transición), o en endotérmicas (cuando lo absorben). El equipo de DSC permite registrar los cambios ocurridos en una matriz durante un calentamiento o enfriamiento programado, midiendo la diferencia de flujo calórico necesaria para mantener a una muestra a la misma temperatura que una referencia. La referencia no debe sufrir transiciones térmicas físicas o químicas en el rango de temperaturas ensayado (Schilardi y col., 2001).

Es posible entonces cuantificar el grado de gelatinización de una muestra utilizando la técnica de DSC (Edwards, 2007).



En los termogramas (Figura 3.10) obtenidos mediante DSC se representa el comportamiento de la matriz durante el tratamiento térmico. En ellos se puede graficar el flujo calórico respecto de la temperatura y observar la presencia de picos o escalones que evidencian una transición. A partir de los termogramas es posible obtener parámetros característicos para evaluar los cambios ocurridos: temperatura de inicio de transición ( $T_i$ ), temperatura de fin de transición ( $T_f$ ), temperatura de pico ( $T_p$ ) y variación de entalpía durante la transición ( $\Delta H$ , calculada como la integral entre el pico y la línea de base).

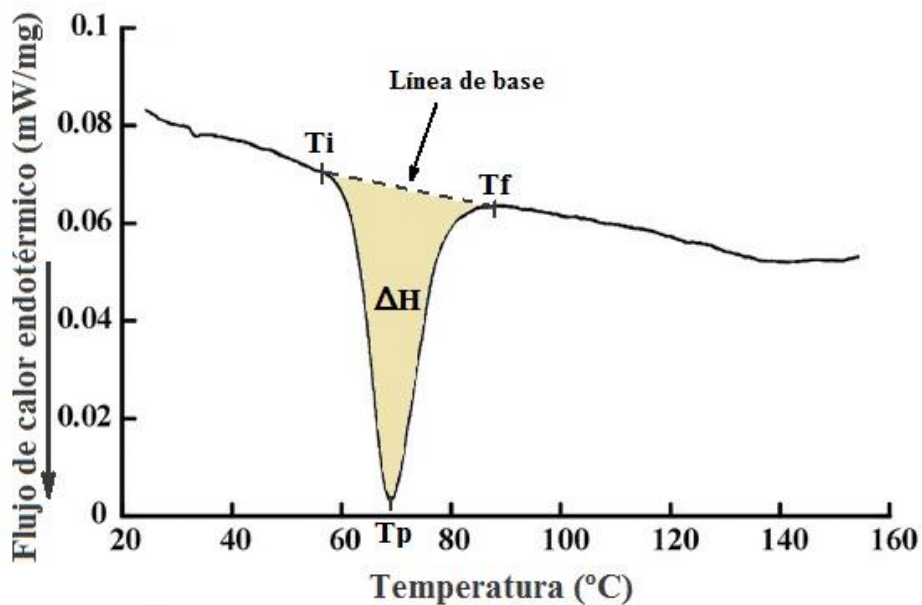
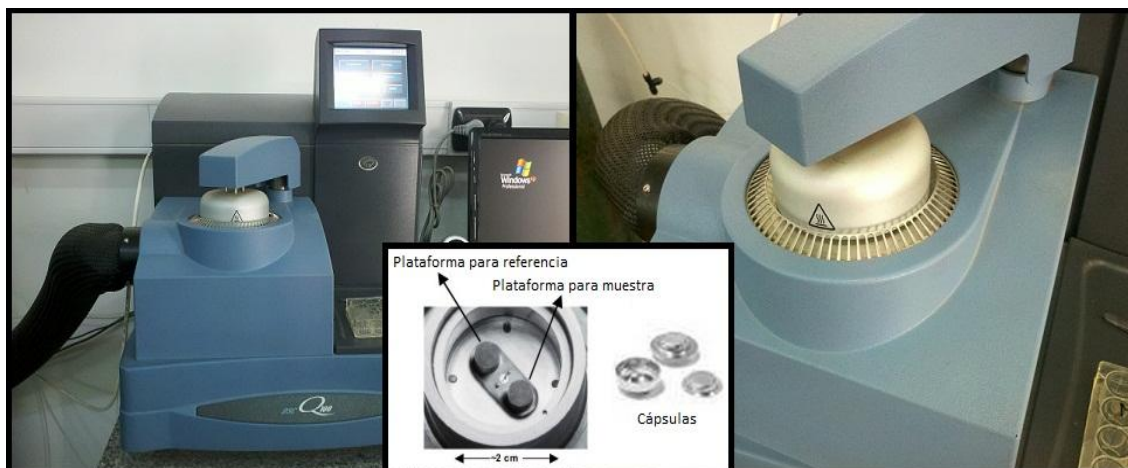


Figura 3.10. Termograma típico para almidón, mostrando los parámetros de  $T_i$ ,  $T_f$ ,  $T_p$  y  $\Delta H$ . (Adaptado de Deschamps y col., 2005)

Para evaluar las transiciones térmicas del almidón durante el proceso de horneado se utilizó un calorímetro diferencial de barrido Q100 (TA Instruments, Estados Unidos) (Figura 3.11) y se analizaron las curvas obtenidas mediante el programa Universal Analysis 2000 v4.2E (TA Instruments, Estados Unidos).

Las condiciones de corrida para todas las muestras incluyeron una isoterma de 5 minutos a 5 °C como tiempo de termostatación, y una rampa de temperatura de 10 °C/min desde 5 °C a 140 °C.



**Figura 3.11. Fotografías del equipo Q100 (TA Instruments), mostrando en detalle la cámara térmica y las cápsulas.**

### 3.2.5. Panificación

#### 3.2.5.1. Formulación de productos panificados

Se formularon masas panarias a 4 niveles de sustitución de harina de trigo por AR: 0% (Control), 10% (AR10), 20% (AR20) y 30% (AR30), con agregado de sal (2%), levadura fresca (3%) y agua según absorción farinográfica de cada mezcla (Tabla 3.1).

#### 3.2.5.2. Curvas de fermentación

Con el objetivo de determinar el tiempo óptimo de permanencia de las masas panarias en la fermentadora, se realizaron curvas de fermentación. Para cada muestra la curva de fermentación se realizó por triplicado. Las masas se elaboraron con el agregado de levadura en un 3% en base seca de harina de trigo (o mezcla harina de trigo – AR), previamente disuelta en agua destilada. La levadura se agregó junto con el agua en el primer minuto de amasado y se procedió según se menciona en 3.2.2. Luego, bollos de 50 g de cada masa fueron colocados en probetas graduadas de 500 ml y se colocaron, sobre ellos, émbolos marcadores y una tapa. Las probetas fueron llevadas a la fermentadora (Brito Hermanos, Argentina) donde permanecieron a 30 °C. Se registró el aumento de volumen en función del tiempo para cada probeta. Los datos

fueron graficados, y las curvas modeladas según la ecuación de Chapman con 3 parámetros (SigmaPlot versión 10.0, Alemania) (EC.3.7).

$$y = a ( 1 - e^{-b \cdot x} )^c \quad \text{EC. 3.7}$$

En la ecuación de Chapman  $y$  representa el incremento de volumen,  $x$  es el tiempo en minutos y el parámetro  $a$  representa el máximo volumen alcanzado durante la fermentación. Se definió como tiempo de fermentación óptimo al tiempo necesario para alcanzar el 75% del volumen máximo. De este modo, nos aseguramos que la masa no colapsará durante el horneado posterior.

### 3.2.5.3. Obtención de productos panificados

La preparación de las masas para la obtención de productos panificados se realizó de igual manera que para las masas utilizadas en las curvas de fermentación (Sección 3.2.5.2).

Una vez finalizado el amasado y el reposo correspondientes, la masa se laminó con una laminadora (Pastafácil, Argentina) cuyos rodillos presentaban 1 cm de separación. Para esto el bollo de masa se dividió en dos porciones aproximadamente iguales, y cada una se hizo pasar por la laminadora. Luego de cada pasada la masa se dobló por la mitad y se rotó 90°. Se repitió este procedimiento cuatro veces y posteriormente la masa se dejó reposar 10 min sobre una base de acrílico y se cubrió con film. Luego se dividió en 7 porciones de aproximadamente 90 g cada una y se realizó un bollado manual. Los bollos se dejaron reposar durante 10 min y se armaron los panes en una armadora (MPZ, Argentina). Se colocaron en bandejas para horno previamente lubricadas con aceite vegetal en aerosol. A cada pan se les hicieron 2 cortes paralelos y oblicuos y se llevaron a la fermentadora. Se fermentaron a 30 °C durante el tiempo óptimo determinado experimentalmente.

Una vez transcurrido el tiempo de fermentación correspondiente se llevaron las bandejas al horno a 210 °C durante 26 min. Este tiempo de cocción corresponde al tiempo óptimo de cocción para el pan control, se determinó experimentalmente en el laboratorio basándose en el color de la corteza. Luego de retirar los panes del horno se dejaron enfriar al menos durante una hora a temperatura ambiente antes de realizar los ensayos para evaluar su calidad.

### 3.2.6. Análisis de calidad de los panes

El agregado de ingredientes diferentes a la harina de trigo en la formulación de los panes puede ser causa de variaciones en la calidad final del producto. La presencia de estos ingredientes, tales como el almidón resistente, podrían provocar cambios en la formación de la red de gluten haciendo que muchos atributos de calidad como el volumen de pan, el alveolado de la miga, o el comportamiento durante el envejecimiento se vean afectados.

Por otra parte, es sabido que el paso del tiempo y las condiciones de almacenamiento podrían provocar modificaciones en algunos de los atributos de calidad del pan, proceso llamado envejecimiento. El mismo es causado principalmente por la retrogradación del almidón. Durante la retrogradación, la amilosa, que ha escapado de los sitios amorfos del gránulo de almidón, busca retornar a la estructura semicristalina de los gránulos nativos migrando hacia los sitios de interacción con la amilopectina y desplazando a las moléculas de agua, las cuales ahora pueden escapar de la matriz por evaporación. En este proceso de retrogradación pueden verse afectados mayormente la humedad y la textura.

Con el objetivo de evaluar la calidad panadera se realizaron tres panificaciones independientes para las muestras Control, AR10, AR20 y AR30. En cada ensayo se usaron panes provenientes de al menos 2 panificaciones diferentes, de forma que los datos constan de replicados reales.

#### 3.2.6.1. Volumen específico

Un buen volumen específico del pan siempre implica un beneficio económico en la producción, ya que se puede obtener un mayor volumen de producto utilizando la misma cantidad de ingredientes en peso. Por otra parte, a igual peso, los consumidores generalmente optan por panes de mayor volumen (Sahi y Little, 2006).

Respecto de la calidad, el volumen específico es un buen indicador de la retención de burbujas de gas por parte de la masa, permite visualizar la calidad proteica de la harina y deja entrever qué tan eficientemente se produjo la formación de la red de gluten durante el procesamiento. El volumen específico está ligado a dos componentes: una buena producción de gas por parte de la levadura, y una eficiente retención de gas por parte de la masa (Sahi y Little, 2006).

En la determinación del volumen específico de los productos panificados se pesaron 4 panes provenientes de dos panificaciones independientes. Cada pan fue pesado en balanza con precisión de 0,1 g. A cada uno se le realizaron 15 medidas de volumen mediante desplazamiento de semillas de colza en un pan-volumenómetro (CIDCA, Argentina) (Figura 3.12) con una columna de 10,18 cm<sup>2</sup> de área transversal. El volumen específico se determinó como el cociente entre el volumen promedio y el peso del pan.



Figura 3.12. Pan-volumenómetro

### 3.2.6.2. Alveolado de la miga

Las características del alveolado de la miga en productos panificados son determinantes de su calidad. De este modo, son de importancia la cantidad, tamaño, forma y distribución de los alvéolos. Un producto de buena calidad se caracteriza por la presencia de una miga bien aireada mientras que migas apelmazadas y con un alveolado deficiente suelen relacionarse con productos de baja calidad.

Se analizó el alveolado de 8 rodajas provenientes de 4 panes de 2 panificaciones independientes. Se empleó un scanner HP Scanjet 4070 para tomar imágenes de las rodajas. Las imágenes se analizaron con Image J1.47v (Wayne Rasband National Institute of Health, Estados Unidos) y se determinaron los siguientes parámetros:

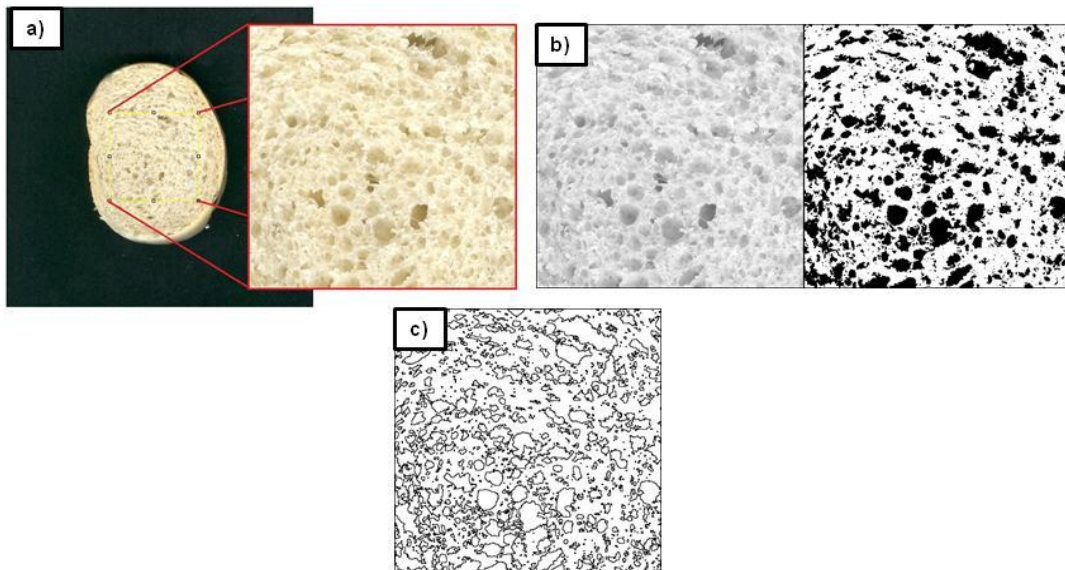
- área alveolar promedio: cuantifica la superficie ocupada por los alvéolos en la imagen bidimensional,
- perímetro: se calcula como el promedio de los perímetros de todos los alvéolos de la imagen,
- moda: es el área alveolar que aparece con mayor frecuencia en la distribución de alvéolos.

- fracción de aire: se calcula como el cociente entre el área total de los alvéolos y el área total de la imagen.
- circularidad: se relaciona con el grado de compactación de la miga. Se calcula como el cociente entre el área del alvéolo y el área de un círculo con igual perímetro (EC. 3.8). Toma valores entre 0 y 1, el valor 1 corresponde a un círculo perfecto y a medida que el valor se acerca a 0 el alvéolo presenta una forma más alargada.

$$\text{Circularidad} = (4 \pi \text{ área}) / \text{perímetro}^2 \quad \text{EC. 3.8}$$

- número de alvéolos: es el número de alvéolos presentes en la imagen analizada.

En la Figura 3.13 se muestra el procedimiento seguido para el análisis de imágenes con el software. En primer lugar, se recortó un cuadrado representativo de 400 x 400 píxeles de la imagen original de la miga escaneada (Figura 3.13a). Luego, el recorte se convirtió en una imagen de 8-bits (Figura 3.13b, izquierda) y posteriormente fue binarizado mediante el filtro “MultiThresholder” en modo IsoData (Figura 3.13b, derecha). A partir de la imagen binarizada se realizó el análisis estadístico de la misma mediante el analizador de partículas del software. Se filtraron las partículas menores de 0,002 cm<sup>2</sup>, obteniéndose la imagen procesada final (Figura 3.13c) y los parámetros deseados.



**Figura 3.13. Esquema mostrando el procesamiento de las imágenes en Image J1.47v. a) extracción de una porción de la imagen original, b) versiones de 8-bit (izquierda) y binarizada (derecha) de la porción extraída, c) imagen procesada final.**



### 3.2.6.3. Color de la corteza

Para evaluar el color de la corteza de los panes se empleó un colorímetro Chroma Meter CR-400 Konica Minolta (Osaka, Japón) calibrado con patrones estándar provistos por el fabricante ( $Y = 93,2$ ;  $x = 0,3133$ ,  $y = 0,3192$ ). Se utilizó como medida objetiva de color el espacio rectangular Hunter  $L$ ,  $a$ ,  $b$  donde el eje  $L$  indica la luminosidad y toma valores entre 0 (negro) y 100 (blanco), en el eje  $a$  los valores positivos indican la dirección del rojo y los negativos la dirección del verde y en el eje  $b$  los valores positivos indican la dirección del amarillo mientras que los negativos la dirección del azul (Figura 3.14)

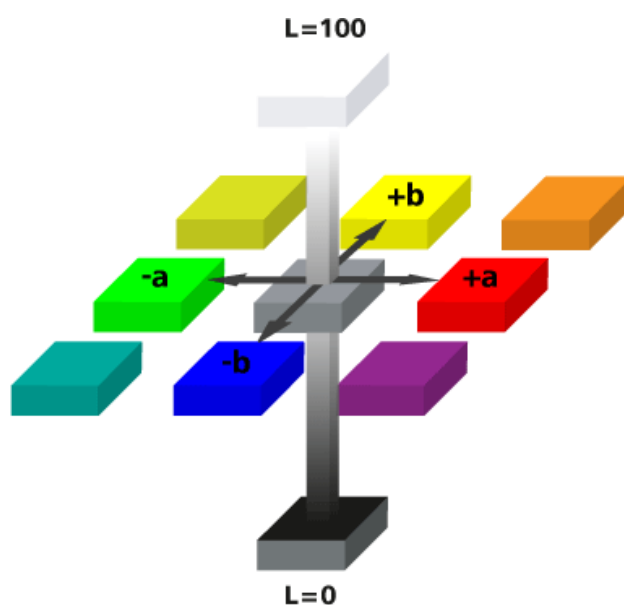


Figura 3.14 Espacio de color Hunter  $L,a,b$   
(<http://corporate.zeiss.com>)

### 3.2.6.4. Ensayos de almacenamiento

En los ensayos de almacenamiento se determinó la humedad y se evaluó la textura de la miga de los panes en el día 0 (día de panificación), el día 1 y el día 3 de almacenamiento. Para cada muestra se almacenaron en cámara a 20 °C 4 panes, provenientes de 2 panificaciones independientes, en bolsas plásticas cerradas una para cada día a ensayar. Se estudió también por DSC la retrogradación del almidón en los panes almacenados en las mismas condiciones, a los días 0, 1, 2 y 3.

#### 3.2.6.4.1. Humedad de la miga

Para determinar la humedad de la miga se retiraron los panes correspondientes al día de ensayo de la cámara de 20 °C. Se prepararon placas de Petri conteniendo aproximadamente 3 g de miga de pan desmigajada pesadas con precisión de 0,0001 g. Las medidas para cada muestra se hicieron por triplicado. Las placas se cubrieron con papel aluminio perforado y se llevaron a estufa a 105 °C hasta peso constante. Una vez pasado el tiempo de secado, las placas se enfriaron a temperatura ambiente en desecador y se pesaron para calcular la pérdida de agua.

#### 3.2.6.4.2. Textura de la miga

Para la realización de los ensayos de textura de la miga se retiraron los panes correspondientes al día de ensayo de la cámara de 20 °C. Con el empleo del texturómetro TA.XT2i (Stable Micro Systems) se realizaron ensayos de TPA en rodajas de pan de 2 cm de espesor. Se comprimieron hasta un 40% de su altura original. Se determinaron los parámetros: dureza (fuerza máxima durante la primera compresión), cohesividad (cociente entre el área del primer pico y segundo pico), consistencia (suma de las áreas del primer y segundo pico), elasticidad (cociente entre los tiempos de la segunda y primera compresión), resiliencia (cociente entre el área del primer ciclo luego del máximo y el área del primer ciclo hasta alcanzar el máximo), y masticabilidad (elasticidad \* dureza \* cohesividad) de cada muestra de pan.

#### 3.2.6.4.3. Retrogradación del almidón

Utilizando el equipo de DSC se hicieron ensayos sobre la miga. Se realizó una isoterma de 5 minutos a 5 °C como tiempo de estabilización. La muestra se corrió empleando una rampa de temperatura de 5 °C/min desde 5 °C hasta 150 °C. La misma fue modulada en 0,5 °C cada 20 segundos.



### 3.2.7. Digestibilidad *in-vitro* del almidón

Se determinó la digestibilidad *in vitro* del almidón en los panes control y con AR (10, 20 y 30) con el empleo del método descrito por Holm y col. (1985), en el cual se toma la tasa de hidrólisis *in vitro* del almidón presente en el alimento como medida de su digestibilidad. El almidón es hidrolizado con la enzima  $\alpha$ -amilasa, liberándose de este modo azúcares reductores los cuales son detectados por su reacción con el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). El DNS es reducido por dichos azúcares dando lugar a un compuesto coloreado (anaranjado), el ácido 3-amino-5-dinitrosalicílico, el cual es detectado espectrofotométricamente ( $\lambda=530$  nm). Los azúcares reductores producidos se expresan como equivalentes de maltosa.

Reactivos utilizados:

- Buffer fosfato: se disuelven en 700 ml de agua 3,03 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3,96 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 0,40 g NaCl. Se lleva a pH 6,9 y a 1 litro en matraz aforado.
- Reactivo 3,5-dinitrosalicílico (DNS): se disuelven en agua destilada 10,0 g de ácido 2,3 dinitrosalicílico, 300 g tartrato de sodio y potasio tetrahidratado y 16 g de NaOH. Se lleva a 1 litro.
- $\alpha$ -amilasa Tipo IA 1200 U/mg (Sigma): Se diluyeron 56  $\mu\text{l}$  de enzima con 16 ml de buffer fosfato ( 30 minutos antes del comienzo de la hidrólisis).
- maltosa anhidra: solución patrón 0,2 mg/ml en agua destilada.

Para cada muestra se pesó por duplicado aproximadamente 1 g de pan, cantidad equivalente a 500 mg de almidón. Las muestras se pesaron en vasos de precipitados en los cuales se agregaron 50 ml de buffer fosfato y se incubaron a 37 °C con agitación constante. Antes de agregar la enzima, se tomaron dos alícuotas de 0,2 ml (tiempo cero) y se determinó el contenido de maltosa antes de iniciar la hidrólisis. Una vez agregada la enzima  $\alpha$ -amilasa se tomaron alícuotas de 0,2 ml a los 5, 15, 30 y 60 min, las cuales se colocaron en tubos de ensayo conteniendo 0,8 ml de agua destilada. Los tubos se calentaron en un baño de agua hirviendo durante 10 min. Una vez fríos, se agregó 1 ml de reactivo de DNS en todos los tubos y se colocaron en baño maría nuevamente durante otros 10 minutos para así favorecer la reacción de los azúcares reductores (principalmente maltosa) con el DNS. A cada tubo se agregaron 15 ml de agua destilada. Se determinó la absorbancia a  $\lambda=530$  nm y se realizó una curva de calibración utilizando maltosa como estándar (0 - 2 mg maltosa/2 ml). Se

calculó la tasa de hidrólisis a los distintos tiempos como los mg de maltosa liberada por gramo de almidón. Para cada muestra, se calculó el contenido de almidón teniendo en cuenta la cantidad de almidón proveniente de la harina y el del almidón resistente.

#### 3.2.8. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el software de análisis de datos OriginPro 8 SR0 v8.0725 (Northampton, Estados Unidos). Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor para determinar, con un nivel de confianza del 95%, si existían o no diferencias significativas entre las medias obtenidas en cada ensayo. Luego se realizó una comparación de medias, a través del test de Bonferroni, para identificar cuáles medias diferían entre sí en un 95%.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### 4.1. Caracterización de harina y mezclas

Se realizaron los farinogramas de las formulaciones que se emplearían para panificar (Tabla 3.3) con la finalidad de evaluar su calidad panadera. En la Figura 4.1 se muestran los farinogramas correspondientes al control y las formulaciones con almidón resistente (AR10, AR20, AR30) y sal (2%).

En los mismos puede apreciarse que el reemplazo de harina de trigo por cantidades crecientes de almidón resistente ocasiona un aumento marcado en el máximo que se observa durante los primeros minutos de amasado. La aparición de este pico en el registro es atribuida a la rápida absorción de agua por parte del almidón y es por este motivo que también puede visualizarse, aunque con poca intensidad, en la muestra control. El agregado de AR no sólo ocasionó el aumento de la intensidad de éste máximo sino que también provocó un desplazamiento del mismo ya que en las mezclas con AR se observa en el primer minuto de amasado mientras que en el control se observó a los 3 minutos de comenzado el mismo.

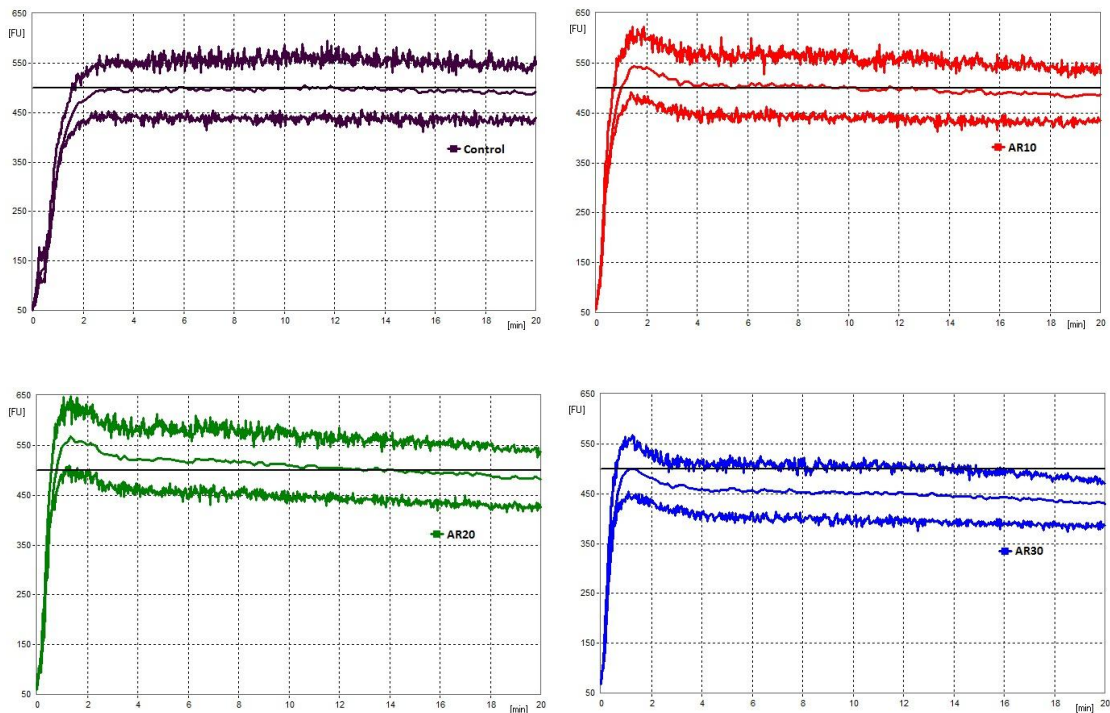


Figura 4.1. Farinogramas obtenidos para las mezclas Control (negro), AR10 (rojo), AR20 (verde) y AR30 (azul).

Por otro lado, los farinogramas permiten visualizar que el agregado de AR ocasiona una leve disminución de la estabilidad de la mezclas respecto al control, lo cual es evidenciado por la caída de las curvas a medida que transcurre el amasado.

En la Tabla 4.1 se muestran los parámetros farinográficos obtenidos a partir de los farinogramas. A pesar de la tendencia a disminuir la estabilidad y el tiempo de desarrollo, el ANOVA y comparación de medias mostró que el reemplazo de harina de trigo por AR no ocasionó variaciones significativas respecto al control ( $P < 0,05$ ) en los parámetros determinados. Estos resultados sugieren que la presencia de AR no afectaría la calidad panadera de la harina aún a concentraciones del 30%.

**Tabla 4.1. Parámetros farinográficos.**

Muestra	A (ml)	B (min)	D (min)	F (UF)
Control	56 ± 0 <sup>a</sup>	11 ± 0 <sup>a</sup>	41 ± 6 <sup>a</sup>	16 ± 1 <sup>a</sup>
AR10	56 ± 0 <sup>a</sup>	9 ± 1 <sup>a</sup>	38 ± 4 <sup>a</sup>	19 ± 7 <sup>a</sup>
AR20	56 ± 1 <sup>a</sup>	7 ± 2 <sup>a</sup>	38 ± 4 <sup>a</sup>	25 ± 5 <sup>a</sup>
AR30	56 ± 0 <sup>a</sup>	9 ± 1 <sup>a</sup>	30 ± 0 <sup>a</sup>	23 ± 0 <sup>a</sup>

Promedio ± Desvío estándar

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

## 4.2. Viscoelasticidad en reómetro oscilatorio

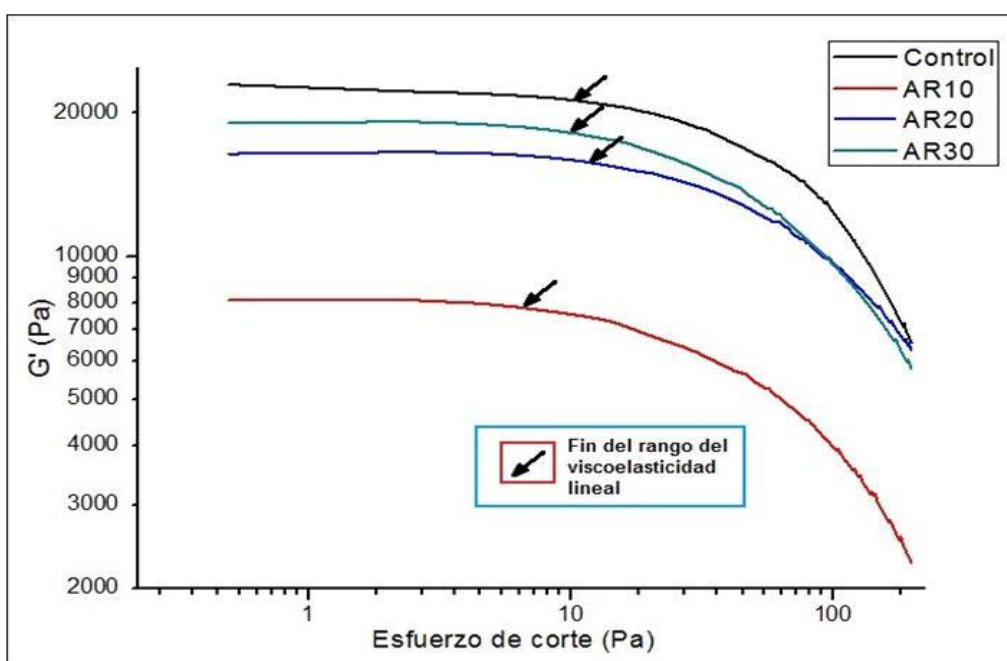
### 4.2.1. Determinación del rango de viscoelasticidad lineal

En la Figura 4.2 se puede observar una representación en escala logarítmica de los barridos de esfuerzo aplicados sobre las masas con la finalidad de determinar el rango de viscoelasticidad lineal (RVL). El RVL está definido por el rango de amplitudes de esfuerzos dentro del cual la integridad de la microestructura de la muestra se mantiene intacta. De este modo, la respuesta ofrecida por el material al esfuerzo aplicado no depende de la magnitud del mismo (Steffe, 1996).

Para las muestras Control, AR20 y AR30 se encontró un RVL cercano a los 10 Pa mientras que para AR10 el rango de viscoelasticidad lineal resultó más acotado, alcanzando como límite superior ( $\sigma_{im}$ ) un valor próximo a los 6 Pa. A valores de esfuerzo superiores al  $\sigma_{im}$  se observó un colapso progresivo de la matriz lo cual se evidenció a través de la caída de los valores de los módulos dinámicos.

La utilización de AR condujo a una disminución tanto de la respuesta elástica ( $G'$ ) como viscosa ( $G''$ ) de la masa. Sin embargo, la mayor variación respecto del Control se registró para AR10 y el menor efecto se observó para AR30. Estos resultados indicarían que aunque la presencia de AR produce variaciones en la respuesta reológica de las masas AR20 y AR30 respecto del Control, las mismas serían capaces de soportar pequeñas deformaciones aplicadas en igual medida que éste. Sin embargo, la sustitución de harina de trigo por AR en un 10% provocó una drástica disminución de la capacidad de la matriz para mantener su integridad ante los esfuerzos aplicados.

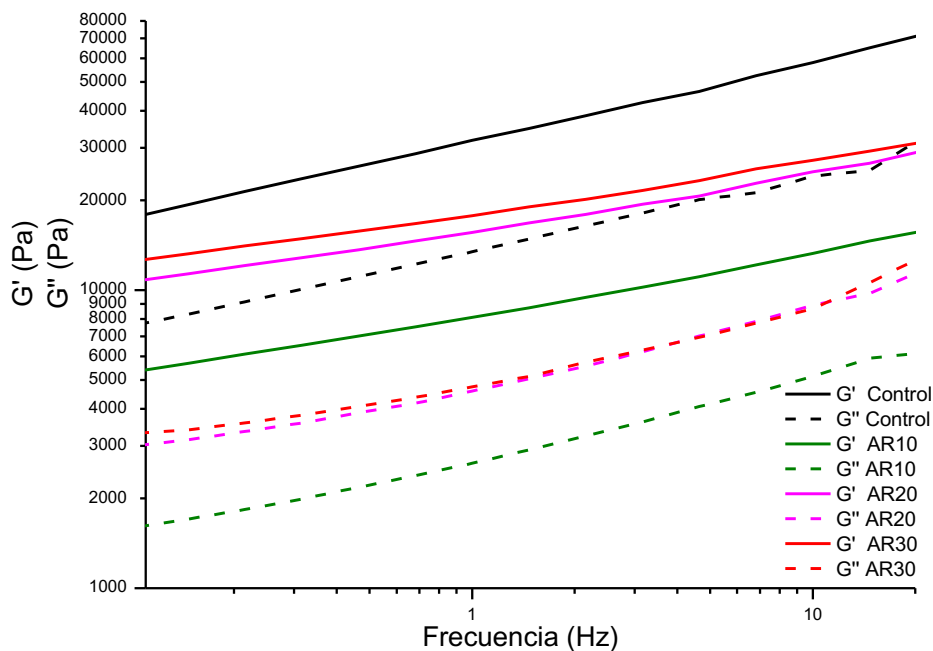
En base a los resultados obtenidos se seleccionó un esfuerzo de corte de 5 Pa para realizar los barridos de frecuencia.



**Figura 4.2.** Rango de viscoelasticidad lineal (RVL) en los registros de módulo elástico en función del esfuerzo de corte aplicado. Las flechas marcan los puntos aproximados en los cuales se considera que finaliza el rango de viscoelasticidad para cada masa.

#### 4.2.2. Espectros mecánicos

Para evaluar cómo la presencia de AR modifica el comportamiento reológico en las masas panarias se realizaron barridos de frecuencia. En la Figura 4.3 se muestran los espectros mecánicos de las muestras control, AR10, AR20 y AR30.

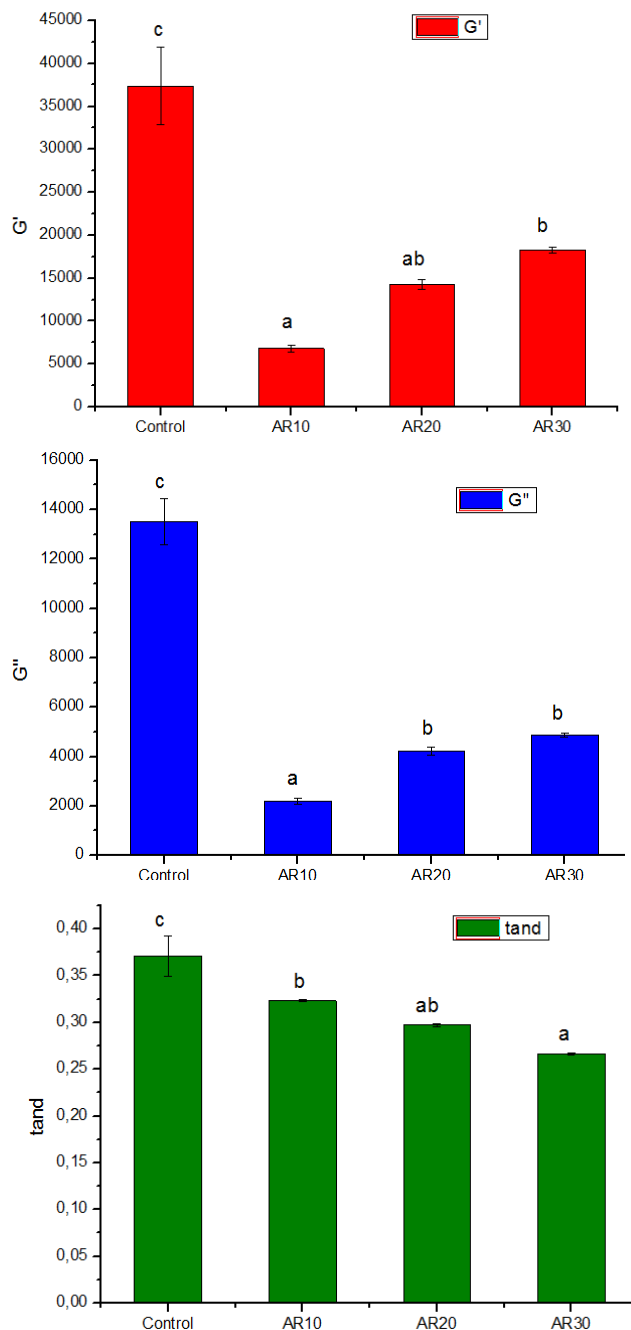


**Figura 4.3. Espectros mecánicos. Se observa una representación de  $G'$  (línea sólida) y  $G''$  (línea cortada) en función de la frecuencia oscilatoria para todas las muestras.**

En todo el rango de frecuencia ensayado las masas presentaron valores del módulo elástico superiores al del módulo viscoso ( $G' > G''$ ) lo cual es característico de un comportamiento de sólido viscoelástico. A diferencia de lo que sucedería con un gel, ambos módulos mostraron una marcada dependencia con la frecuencia aplicada.

Los barridos de frecuencia muestran que todas las masas sustituidas con AR exhibieron valores de  $G''$  y  $G'$  menores a las del Control, siendo la muestra AR10 la que presentó la disminución más importante y AR30 la de menor magnitud. En la Figura 4.4 se muestran los valores alcanzados por  $G''$ ,  $G'$  y  $\tan \delta$  para las masas control y con AR a 1 Hz. Aunque el empleo de AR ocasionó una disminución significativa de ambos módulos respecto al control también se observó una disminución de la tangente del ángulo de desfase lo que permite inferir que la caída del módulo viscoso fue mayor que la del módulo elástico. Por lo tanto, el agregado de AR en la masa conduce a la pérdida de las características viscosas en mayor medida que de las elásticas. Por otro lado, resulta interesante observar que el efecto más marcado por la utilización de AR se observó en AR10, la formulación con menor contenido de AR.

Dreese y col. (1988) observaron en masa una disminución progresiva en el módulo elástico a medida que incrementaban el contenido de agua de la misma, lo cual concuerda con el hecho de que masas con mayor contenido de agua son más fácilmente deformables. Aunque en este caso todas las masas se prepararon con la cantidad óptima de agua (A, absorción farinográfica), las masas con AR mostraron un comportamiento similar al que tendrían masas preparadas con exceso de agua. Dado que todas las formulaciones presentaron igual A (Tabla 4.1) las diferencias observadas podrían atribuirse a una mayor disponibilidad del agua en los sistemas con AR lo que podría dar lugar a más fácilmente deformables y con menor  $G''$ . Por otro lado, menores valores de  $G''$  también se han relacionado con un menor entrecruzamiento de la red de gluten (Khatkar y col., 1995).



**Figura 4.4. Módulos elástico,  $G'$ , (rojo), viscoso,  $G''$ , (azul) y  $\tan \delta$  (verde) de las muestras ensayadas. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ )**

La formulación con una relación 90:10 de harina de trigo:AR mostró menor  $G''$  que las formulaciones con mayor contenido de AR (AR20, AR30) y al ir incrementando el contenido de AR el comportamiento mostrado por la muestra se acercó al exhibido por el control. Dado que el AR empleado es un almidón de trigo modificado químicamente a través de la introducción de grupos fosfato en su estructura, éste en la masa estaría aportando una carga neta negativa. Por otro lado, al pH de la masa (~ 5) las proteínas del gluten exhiben una carga neta positiva por lo que sería posible el



establecimiento de interacciones electrostáticas entre ambos. A su vez, estas interacciones podrían darse en mayor o menor medida dependiendo de la presencia de otros componentes que también pudieran participar de las mismas. Las masas se elaboraron con un 2% de NaCl, el cual podría actuar apantallando en alguna medida las cargas de los grupos cargados, en particular de los grupos fosfatos. En las formulaciones con alto contenido de AR el apantallamiento por parte del NaCl no sería relevante mientras que en el caso de AR10 sí. De esta forma, la presencia de una carga neta negativa en las formulaciones AR20 y AR30 podría estar favoreciendo el establecimiento de interacciones electrostáticas entre las proteínas de la matriz y el AR, las cuales contribuirían a las características elásticas de la masa.

De este modo, la presencia de AR podría dar lugar a redes con un menor entrecruzamiento lo que podría verse traducido en menores valores de  $G''$ . Sin embargo, este efecto negativo sería relevante sólo en niveles bajos de AR.

#### 4.2.3. Análisis de perfil de textura (TPA) en masa

La masa de harina de trigo es un sistema complejo cuyas propiedades viscoelásticas se encuentran determinadas por las interacciones establecidas entre sus componentes (Rodríguez-Sandoval y col., 2005). Por lo tanto, el comportamiento mostrado por una masa cuando es sometida a una compresión depende tanto de su composición como de las interacciones que vinculan a sus componentes. En el TPA la masa es sometida a dos ciclos de compresión y descompresión con un período de reposo entre ambos y se registra el esfuerzo necesario para realizar dichos ciclos. Por lo que permite evaluar el efecto ejercido por los componentes de la masa y por distintas condiciones de proceso.

En la Figura 4.5 se muestra el perfil de textura mostrado por las masas estudiadas. A partir del mismo se obtuvieron los parámetros texturales: dureza, cohesividad, consistencia, adhesividad, elasticidad y resiliencia que se muestran en la Tabla 4.2.

La dureza de la masa se vio afectada por la presencia de AR de diferente modo dependiendo del nivel empleado. La masa AR10 presentó menor dureza que el control y que las otras formulaciones con AR. Mientras que AR20 y AR30 no presentaron diferencias significativas respecto al control. De este modo, la dureza de la masa siguió la misma tendencia observada para  $G''$  en el ensayo en reómetro oscilatorio.

Asimismo, la gomosidad (dureza \* cohesividad) al ser un parámetro que depende fuertemente de la dureza, siguió la misma tendencia que ésta.

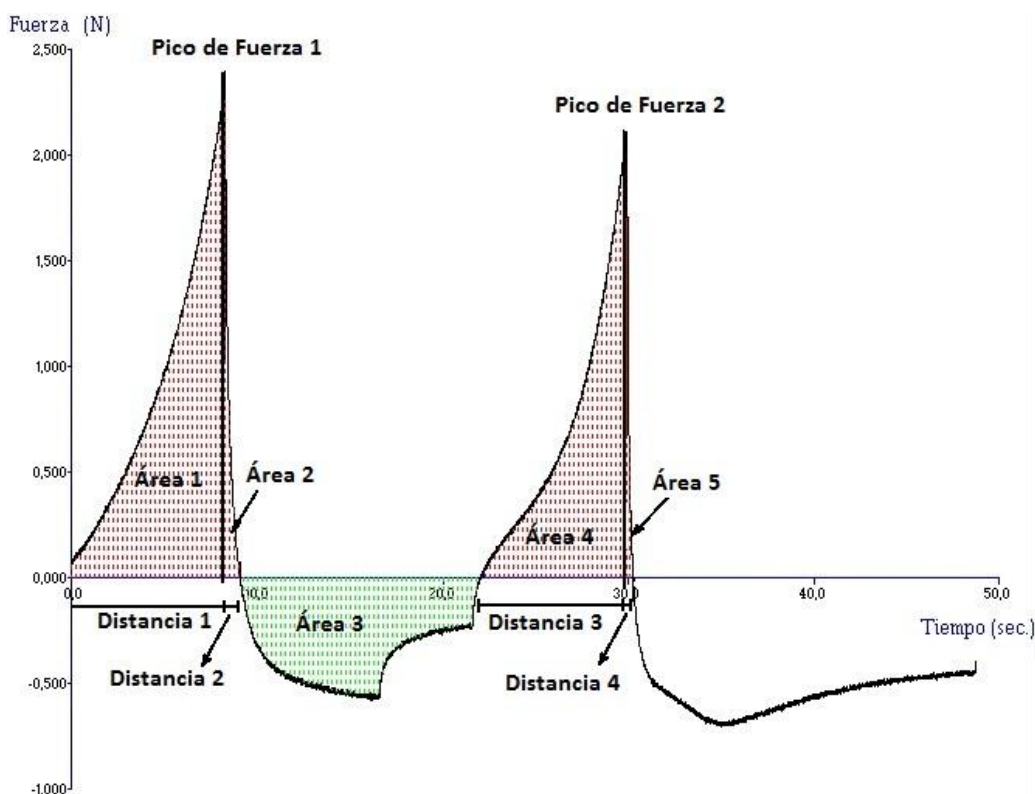


Figura 4.5. Perfil de textura presentado por la masa. En el mismo se indican las distancias, fuerzas y áreas utilizadas para el cálculo de los parámetros texturales.

Tabla 4.2. Parámetros texturales de las masas

	Control	AR10	AR20	AR30
Dureza (N)	1,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,2 <sup>b</sup>
Consistencia (N.s)	11 ± 1 <sup>c</sup>	8 ± 1 <sup>a</sup>	9 ± 1 <sup>b</sup>	9 ± 1 <sup>b</sup>
Cohesividad	0,75 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,75 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,74 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,75 ± 0,01 <sup>a</sup>
Adhesividad (N.s)	- 4,9 ± 0,7 <sup>a</sup>	- 3,9 ± 0,7 <sup>b</sup>	- 4,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	- 4,6 ± 0,3 <sup>a</sup>
Elasticidad	0,90 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,89 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,90 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,91 ± 0,01 <sup>b</sup>
Resiliencia	0,071 ± 0,010 <sup>c</sup>	0,064 ± 0,007 <sup>b</sup>	0,059 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,058 ± 0,008 <sup>a</sup>
Gomosidad (N)	1,2 ± 0,3 <sup>b</sup>	0,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,1 <sup>b</sup>

Promedio ± Desvío estándar

Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

La consistencia de la masa disminuyó significativamente por la presencia del AR siendo éste efecto más marcado para el nivel más bajo (AR10). Al incrementar la concentración de AR se observó un aumento de la consistencia, acercándose a la del control.

La adhesividad de AR20 y AR30 no se vio modificada respecto al control mientras que AR10 exhibió una disminución significativa de la misma. Dado que la adhesividad podría afectar a la manipulación de la masa durante el proceso de panificación, por ejemplo en el armado de los panes, los resultados obtenidos son positivos ya que nos indican que para las formulaciones planteadas no serían necesarias variaciones en el proceso.

La resiliencia, parámetro que refleja la respuesta elástica instantánea de la masa ante una deformación, se vio ligeramente afectada por el uso de AR, observándose una disminución significativa de la misma con todos los niveles de AR empleados. En este caso el efecto fue menos marcado para AR10.

La cohesividad y la elasticidad no mostraron diferencias significativas respecto al control. Por lo tanto, la integración de los componentes de la matriz en presencia del AR es similar a la presente en la masa control, lo cual puede deberse a que el almidón resistente empleado es almidón de trigo. Por otro lado, el hecho de que las fuerzas que vinculan a los componentes de la matriz se mantengan puede conllevar al mantenimiento de las características elásticas de la misma.

En general, las masas AR20 y AR30 no mostraron grandes variaciones respecto al control lo cual nos permitiría utilizar formulaciones con un alto contenido de fibra sin que ocurran grandes modificaciones en las características texturales de la masa.

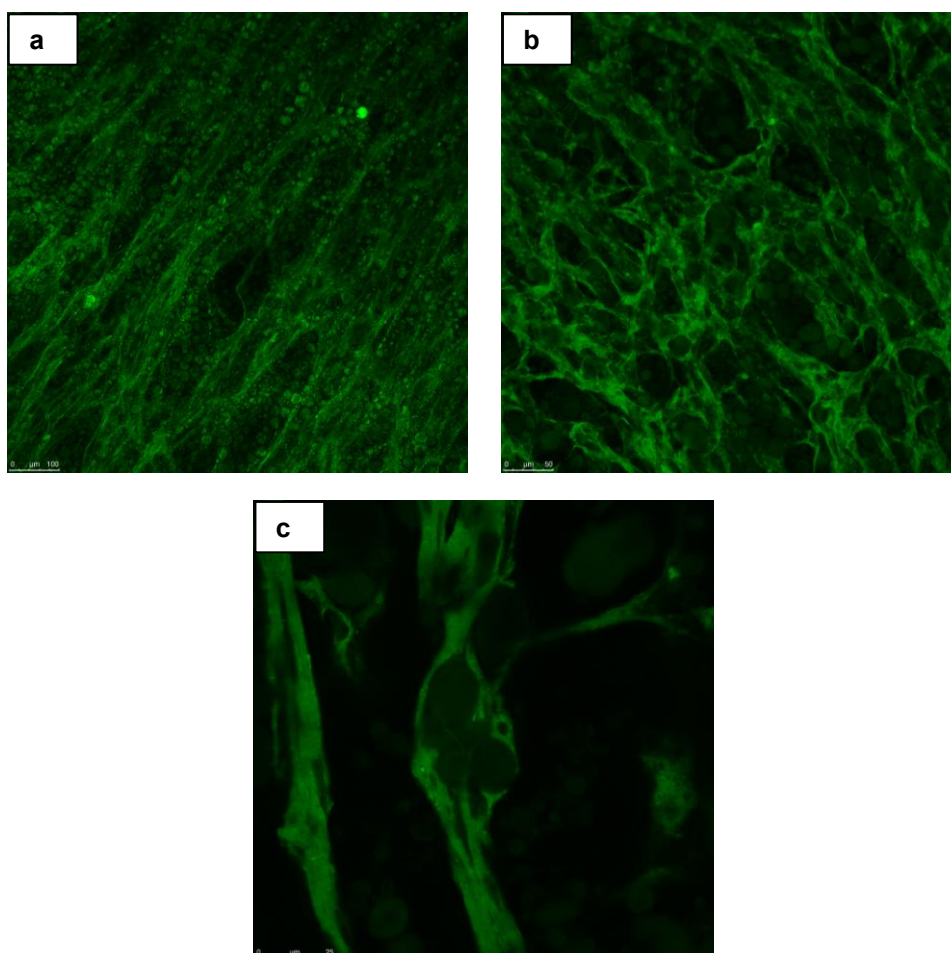
#### 4.3. Análisis microestructural

##### 4.3.1. Análisis microestructural por microscopía confocal láser de barrido (CSLM)

La microscopía confocal láser de barrido es una técnica no invasiva que permite visualizar la microestructura de un sistema minimizando el riesgo de observar artefactos generados durante la preparación de la muestra (Newberry y col., 2003). CSLM se ha empleado con éxito para estudiar la microestructura de masa de harina de trigo destinada a panificación (Dürrenberger y col., 2001; Li, y col., 2004; Baier-Schenk y col., 2005; Peighmbardoust y col., 2006; Jekle y Becker, 2011; Correa y col., 2014). En este trabajo se ha empleado con el objetivo de observar si la

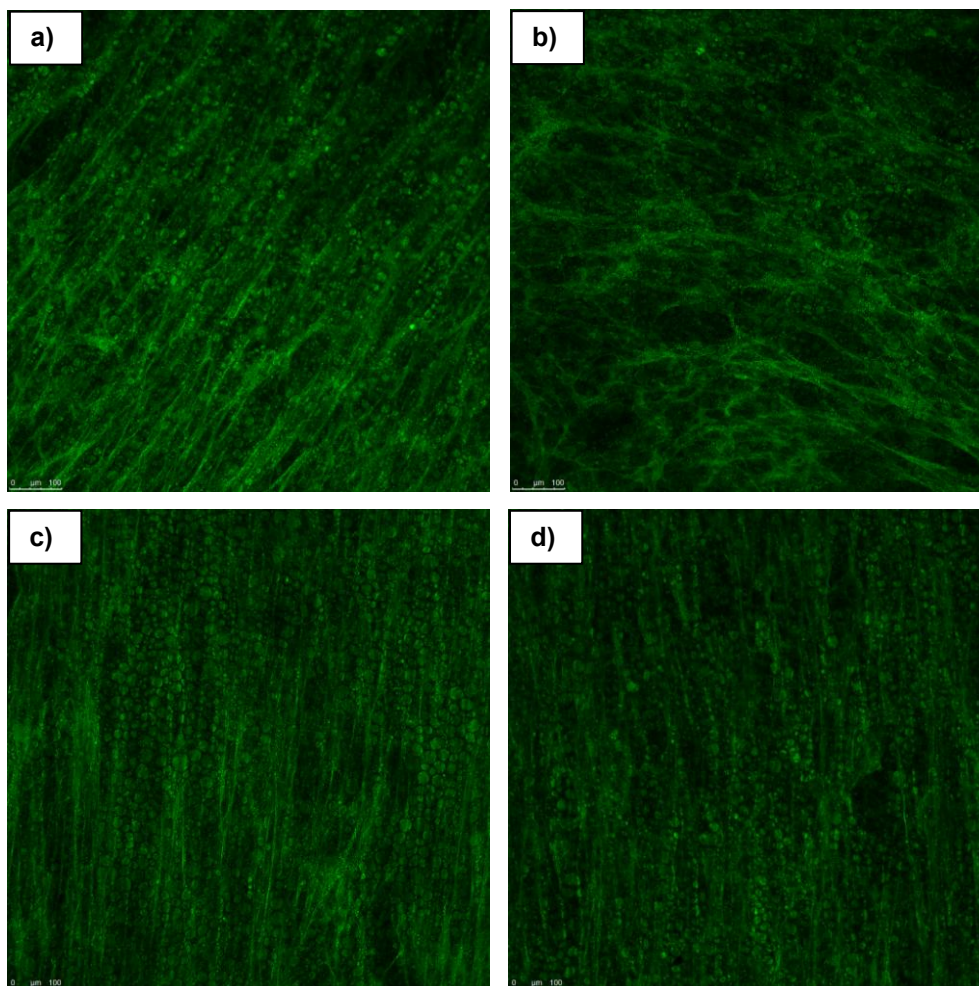
microestructura de las masas panarias se ve modificada por el agregado de AR. Se obtuvieron micrografías con diferente nivel de magnificación (10 X, 20 X y 63 X) de los extendidos de masa teñidos con Rodamina B y FITC.

En la Figura 4.6 se muestran micrografías representativas de la masa Control con cada uno de los aumentos mencionados. En todas las micrografías pueden distinguirse los gránulos de almidón y la red de gluten, con el menor aumento (10 X) se tiene una visión más global de la estructura de la masa y al ir aumentando el nivel de magnificación se obtiene más detalle de la microestructura de la matriz. En la micrografía a 63 X (Figura 4.6c) puede apreciarse como la red de gluten envuelve a varios gránulos de almidón. Vale la pena resaltar que con esta técnica no es posible diferenciar los gránulos de almidón de la harina y los correspondientes al AR ya que ambos son de trigo y además porque la modificación química que presenta AR no altera su morfología. De este modo, esta técnica permite apreciar la disposición de la red de gluten y su relación con los gránulos de almidón endógeno y agregado.



**Figura 4.6.** Micrografías de la masa Control obtenidas por microscopía confocal láser de barrido mediante tinción con FITC y Rodamina B. a) 10 X, b) 20 X, c) 63 X.

Para evaluar el efecto del reemplazo parcial de harina de trigo por almidón resistente se escogieron las micrografías correspondientes al aumento de 10 X debido a que en ellas es posible observar mejor las características generales de la matriz. En la Figura 4.7 se muestran micrografías representativas de cada una de las formulaciones. Las masas con mayor contenido de almidón resistente (AR20 y AR30) muestran mayor semejanza con el control que AR10. En estas muestras los filamentos de la red de gluten parecen encontrarse más alineados entre sí. Por otro lado, AR10 pareciera presentar una estructura más abierta pero manteniendo un cierto grado de entrecruzamiento.

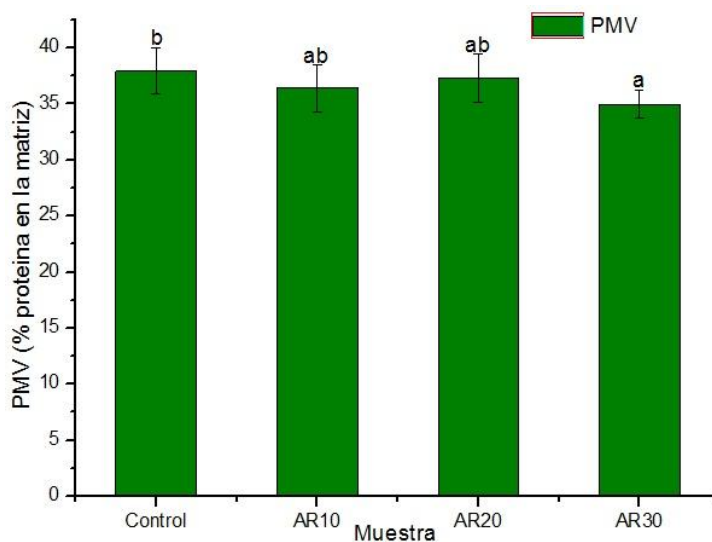


**Figura 4.7. Micrografías a 10 X. a) Control, b) AR10, c) AR20 y d) AR30.**

Sin embargo, el análisis estadístico de los valores obtenidos para la dimensión fractal ( $D$ ) de las muestras reveló que no existen diferencias significativas entre ellos. Los valores de  $D$  se encontraron entre 1,71 (AR30) y 1,73 (Control y AR20). Esto



sugiere que la presencia de los gránulos de AR no modifica el nivel de complejidad de la red de gluten, en ninguno de los niveles de sustitución de AR ensayados. En la Figura 4.8 se muestra el porcentaje de proteína de la matriz (PMV), habiéndose encontrado diferencias significativas en los valores de PMV para las muestras Control y AR30. Un menor valor de PMV podría deberse a que en esta muestra se tiene el mayor reemplazo de harina de trigo por AR, por lo que esta disminución de PMV estaría reflejando la dilución de la proteína de la matriz en el sistema.



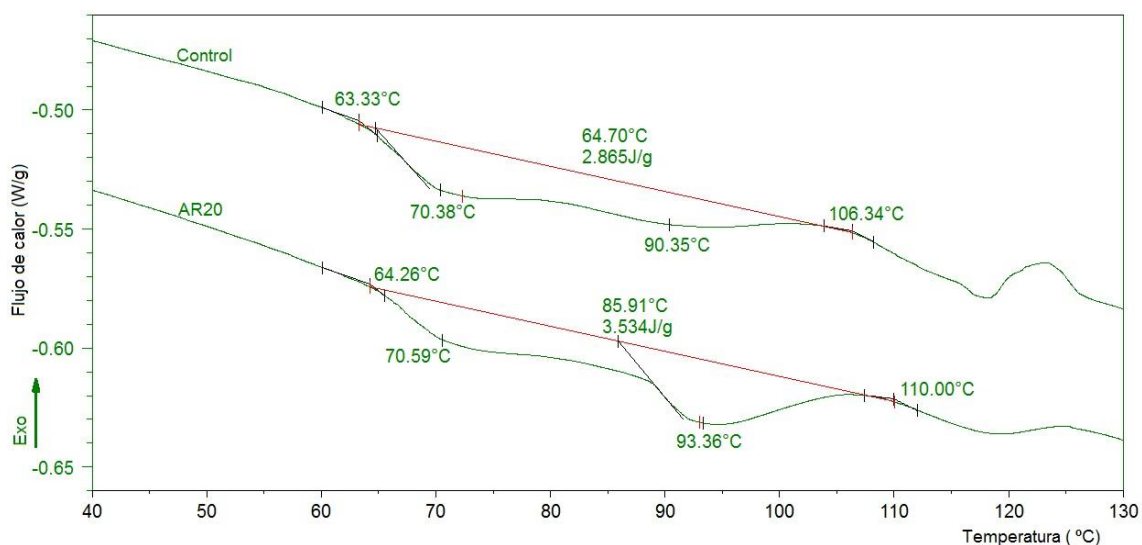
**Figura 4.8. Gráfico de barras donde se representa la comparación de medias para PMV. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).**

#### 4.3.2. Gelatinización del almidón en masa

Durante el proceso de gelatinización el gránulo de almidón, en presencia de agua, se hidrata y pierde su organización y cristalinidad. La relación almidón/agua determina si el proceso ocurre en una o dos etapas. Si el agua se encuentra en exceso la transición presenta una única endoterma. Por otro lado, si el agua es limitante se observa una segunda endoterma a mayores temperaturas (Biliaderis, 1983). Esto se ha atribuido a que los cristales menos estables funden primero originando la primera endoterma y dejando menos agua disponible para los cristales más estables, los que al fundir dan lugar a la segunda endoterma (Evans y Haisman, 1982; Zobel, 1984). Para otros autores el perfil de endotermas múltiples refleja procesos de fusión y reorganización granular que ocurren simultáneamente durante la gelatinización (Biliaderis, 1992).

Dentro del proceso de panificación la gelatinización del almidón es una transición importante ya que durante el horneado ésta determina el máximo volumen alcanzado por la pieza de pan, contribuye a las características de la miga (Eliasson, 2003) y además permite que el almidón sea digerible.

En la Figura 4.9 se muestran a modo de ejemplo los termogramas obtenidos para el control y AR20, en los mismos se indican las temperaturas de inicio, finalización y pico de la transición.



**Figura 4.9. Termogramas de las masas Control y AR20 con el detalle del análisis de los picos de gelatinización del almidón.**

La gelatinización del almidón exhibió en todos los casos dos endotermas, la primera cercana a los 70 °C y la segunda cercana a los 90 °C, lo cual nos indica que en la masa el agua se encuentra como limitante. Además, en los termogramas puede observarse una tercera transición cercana a los 115 °C la cual se asocia a la disociación del complejo formado entre la amilosa y los lípidos endógenos de la harina.

En la Tabla 4.3 se muestran los valores hallados para la entalpía aparente y temperaturas características de la gelatinización. Se encontró que no existen diferencias significativas para  $T_i$ ,  $T_{p1}$ ,  $T_{p2}$  y  $T_f$ , entre ninguna de las muestras. Esto sugiere que la presencia de AR en la matriz no desplaza las temperaturas características de gelatinización que corresponden al almidón de la harina de trigo.

Además, se realizaron corridas de DSC en sistemas modelos de AR, sal y agua (según la absorción farinográfica de las masas). Estas muestras exhibieron una única endoterma con temperaturas de inicio, pico y fin de gelatinización cercanas a 78 °C; 82 °C y 86 °C, respectivamente; siendo la  $\Delta H$  de 5,5 J/g. Estas corridas permitieron

observar que el pico correspondiente a la gelatinización del AR se solapa con las endotermas del almidón de la harina.

Cuando se analizaron las entalpías de gelatinización en masa, se observó que en este caso sí hubo diferencias significativas entre la masa Control y las que contienen AR en su formulación, siendo estas últimas de mayor valor. Estos resultados indicarían que las masas con AR requieren de la absorción de mayor cantidad de calor que el Control para que se produzca la gelatinización de los almidones.

**Tabla 4.3. Gelatinización del almidón en masa**

Muestra	$T_i$ (°C)	$T_{p1}$ (°C)	$T_{p2}$ (°C)	$T_f$ (°C)	$\Delta H^*$ (J/g, base seca)
Control	$64 \pm 1^a$	$71 \pm 1^a$	$92 \pm 2^a$	$107 \pm 1^a$	$2,8 \pm 0,0^a$
AR10	$61 \pm 0^a$	$69 \pm 0^a$	$91 \pm 1^a$	$105 \pm 1^a$	$4,3 \pm 0,4^b$
AR20	$63 \pm 1^a$	$71 \pm 1^a$	$92 \pm 1^a$	$108 \pm 1^a$	$4,9 \pm 0,4^b$
AR30	$62 \pm 3^a$	$70 \pm 0^a$	$90 \pm 1^a$	$107 \pm 1^a$	$5,2 \pm 0,1^b$

\* Entalpía de gelatinización aparente

Promedio  $\pm$  Desvío estándar

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

#### 4.4. Ensayos en productos panificados

##### 4.4.1. Curvas de fermentación

Con la finalidad de evaluar el efecto ocasionado por el reemplazo de harina de trigo por AR sobre la fermentación de la masa destinada a la producción de pan se realizaron curvas de fermentación. El modelo de Chapman ajustó de forma adecuada a los datos experimentales, tanto para el Control como para AR30. Se encontraron ajustes similares para las muestras AR10 y AR20 ( $r^2 > 0,9777$  en todos los casos). Esto indica que el modelo de Chapman es adecuado para el cálculo de los tiempos de fermentación. En la Figura 4.10 se muestran a modo de ejemplo las curvas de la muestra Control y AR30, en las mismas se muestra el ajuste logrado con el modelo utilizado y el máximo incremento del volumen alcanzado por las muestras ( $\Delta V_{max}$ ).

Dado que la masa cuando comienza la cocción en el horno continúa dilatándose hasta el momento en que se fija la estructura de la miga, es necesario que el tiempo de leudado sea menor al tiempo necesario para alcanzar el máximo volumen de leudado. De este modo evitamos una excesiva expansión de la masa en el horno y el consecuente colapso de la misma. Por lo tanto, el tiempo de fermentación se estableció como el tiempo necesario para alcanzar el 75% del  $\Delta V_{max}$ .



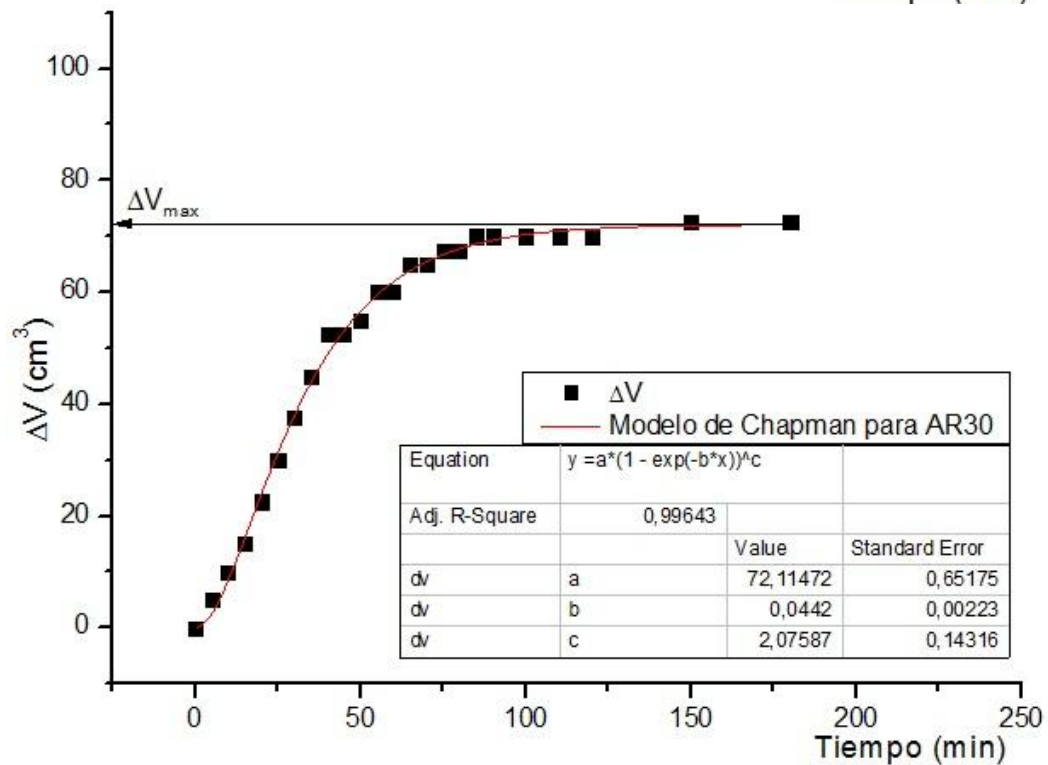
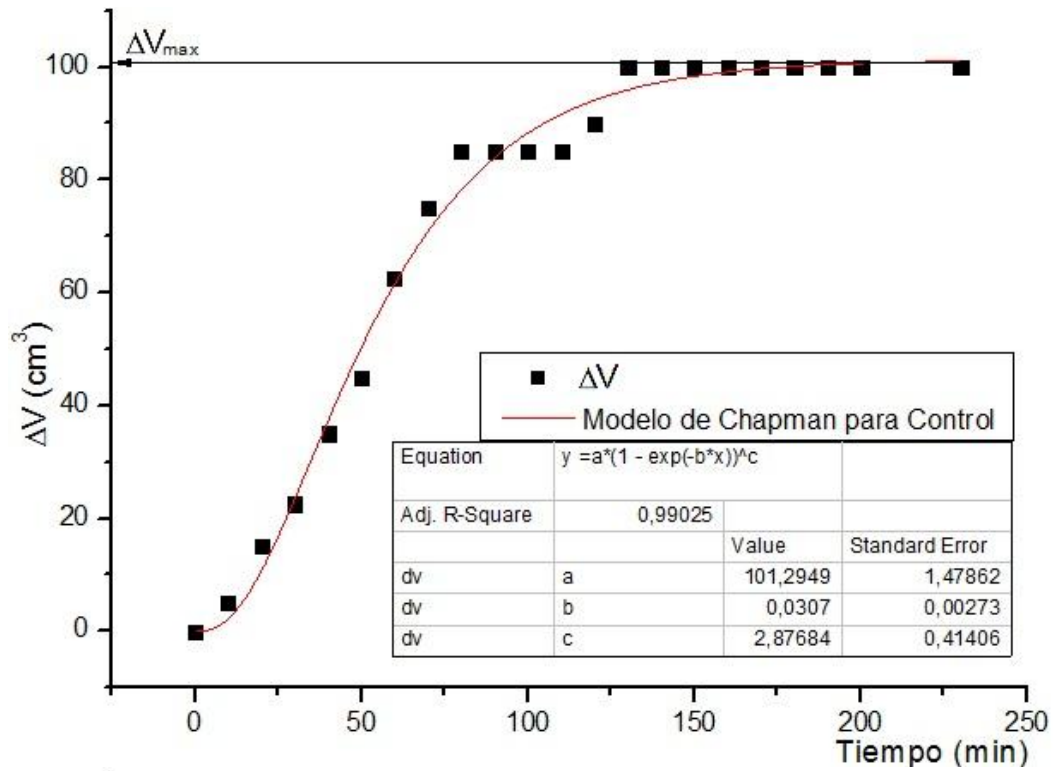


Figura 4.10. Curva de fermentación para la muestra a) Control; b) AR30. Se observan los datos experimentales (puntos) y el ajuste de los mismos a la curva según el modelo de Chapman (línea continua). La tabla muestra los parámetros obtenidos. ( $r^2 = 0,99025$ ).

En la Tabla 4.4 se muestran los tiempos óptimos de fermentación calculados a partir del modelo y la máxima variación de volumen presentada por cada muestra. El test de comparación de medias mostró que existen diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los valores de  $\Delta V_{\max}$  presentados por todas las muestras con AR y el Control.

**Tabla 4.4. Tiempos de fermentación.**

Muestra	$\Delta V_{\max}$ (cm <sup>3</sup> )	Tiempo de fermentación (min)
Control	101 ± 0 <sup>c</sup>	77 ± 0 <sup>d</sup>
AR10	82 ± 5 <sup>b</sup>	55 ± 1 <sup>b</sup>
AR20	85 ± 2 <sup>b</sup>	63 ± 2 <sup>c</sup>
AR30	71 ± 1 <sup>a</sup>	47 ± 2 <sup>a</sup>

Promedio ± Desvío estándar

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

Las variaciones máximas de volumen sugieren entonces que la presencia de almidón resistente afecta al proceso de fermentación ya que la sustitución de harina de trigo por AR en un 10% ya es suficiente para ocasionar una disminución del máximo volumen alcanzado. Asimismo, el empleo de AR en un 30% condujo a una reducción del 30% del máximo volumen alcanzado durante la fermentación.

Cuando se analizaron los tiempos de fermentación se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de todas las muestras, habiendo mostrado el Control el mayor tiempo de fermentación. Dado que el tiempo de fermentación óptimo se determinó como el tiempo necesario para alcanzar el 75% de  $\Delta V_{\max}$  y a que el control alcanzó un mayor valor de  $\Delta V_{\max}$  éste necesitó también un mayor tiempo para fermentar. Los resultados encontrados sugieren que existe un efecto de dosis ya que al implementar AR en cantidades crecientes en la formulación se observó una reducción del tiempo de fermentación.

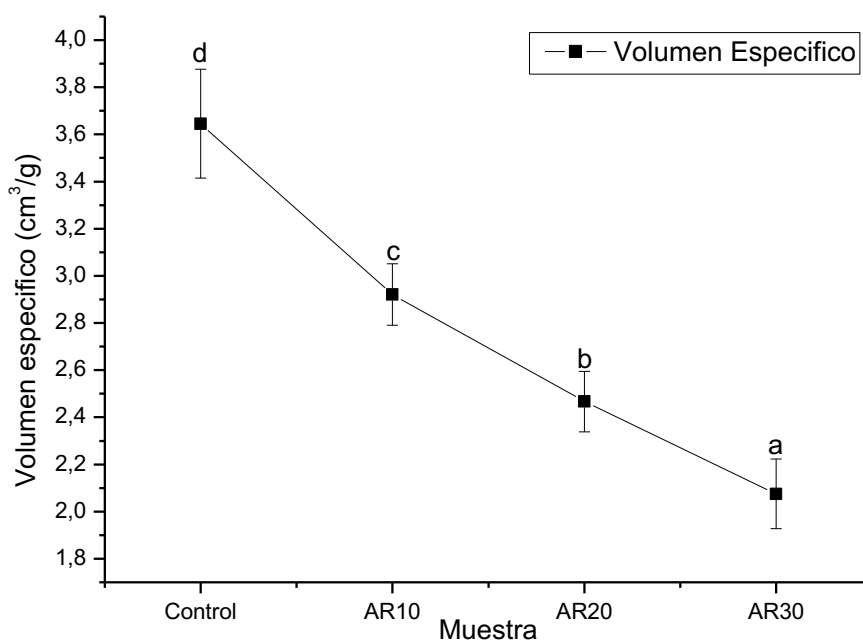
A pesar de que un menor incremento del volumen final en las masas con AR podría conllevar a la obtención de panes con un menor volumen específico debemos tener en cuenta potenciales efectos positivos. Por un lado, el empleo de niveles tan elevados de fibra presenta un potencial beneficio para la salud y por otro lado, estas formulaciones necesitan menores tiempos de fermentación que el Control por lo cual se estaría acortando el proceso de panificación, lo que podría ser favorable para el elaborador.

#### 4.4.2. Análisis de calidad de los panes

##### 4.4.2.1. Volumen específico de pan

El volumen específico del pan es un marcador muy importante de la calidad del mismo. La obtención de un buen volumen específico de pan se encuentra relacionada con la capacidad que presenta la masa para retener atrapado dentro de su estructura al gas producido durante la fermentación. Lo cual depende del desarrollo alcanzado por la red de gluten durante la etapa de amasado.

En la Figura 4.11 se muestran los resultados obtenidos para el volumen específico de los panes Control y con AR. El empleo de almidón resistente condujo a una disminución del volumen específico del pan, habiéndose observado una disminución progresiva del mismo con concentraciones crecientes de AR. A través del análisis estadístico de los resultados se encontró que todas las muestras presentan diferencias significativas entre ellas ( $P < 0,05$ ) sugiriendo que la utilización de AR en la formulación de los panes conlleva un detrimento del volumen específico.



**Figura 4.11. Gráfico que representa la tendencia del volumen específico de pan para cantidades crecientes de AR ( $P < 0,05$ ).**

#### 4.4.2.2. Alveolado de la miga

Las características del alveolado de la miga en productos panificados son determinantes de su calidad. De este modo, son de importancia la cantidad, tamaño, forma y distribución de los alvéolos. Un producto de buena calidad se caracteriza por la presencia de una miga bien aireada mientras que migas apelmazadas y con un alveolado deficiente suelen relacionarse con productos de baja calidad.

Los parámetros estructurales obtenidos para la evaluación del alveolado de la miga se enumeran en la Tabla 4.5.

**Tabla 4.5. Parámetros estructurales de la miga**

Muestra	% Aire	Área alveolar promedio (cm <sup>2</sup> )	N	Perímetro (cm)	Circularidad
Control	28 ± 1 <sup>b</sup>	0,012 ± 0,002 <sup>b</sup>	183 ± 26 <sup>ab</sup>	0,66 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,44 ± 0,01 <sup>a</sup>
AR10	28 ± 1 <sup>b</sup>	0,011 ± 0,001 <sup>b</sup>	195 ± 20 <sup>ab</sup>	0,63 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,45 ± 0,01 <sup>a</sup>
AR20	26 ± 1 <sup>b</sup>	0,011 ± 0,001 <sup>b</sup>	178 ± 24 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,43 ± 0,01 <sup>a</sup>
AR30	19 ± 1 <sup>a</sup>	0,008 ± 0,001 <sup>a</sup>	214 ± 9 <sup>b</sup>	0,52 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,01 <sup>a</sup>

Promedio ± Desvío estándar

N: número de alvéolos

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

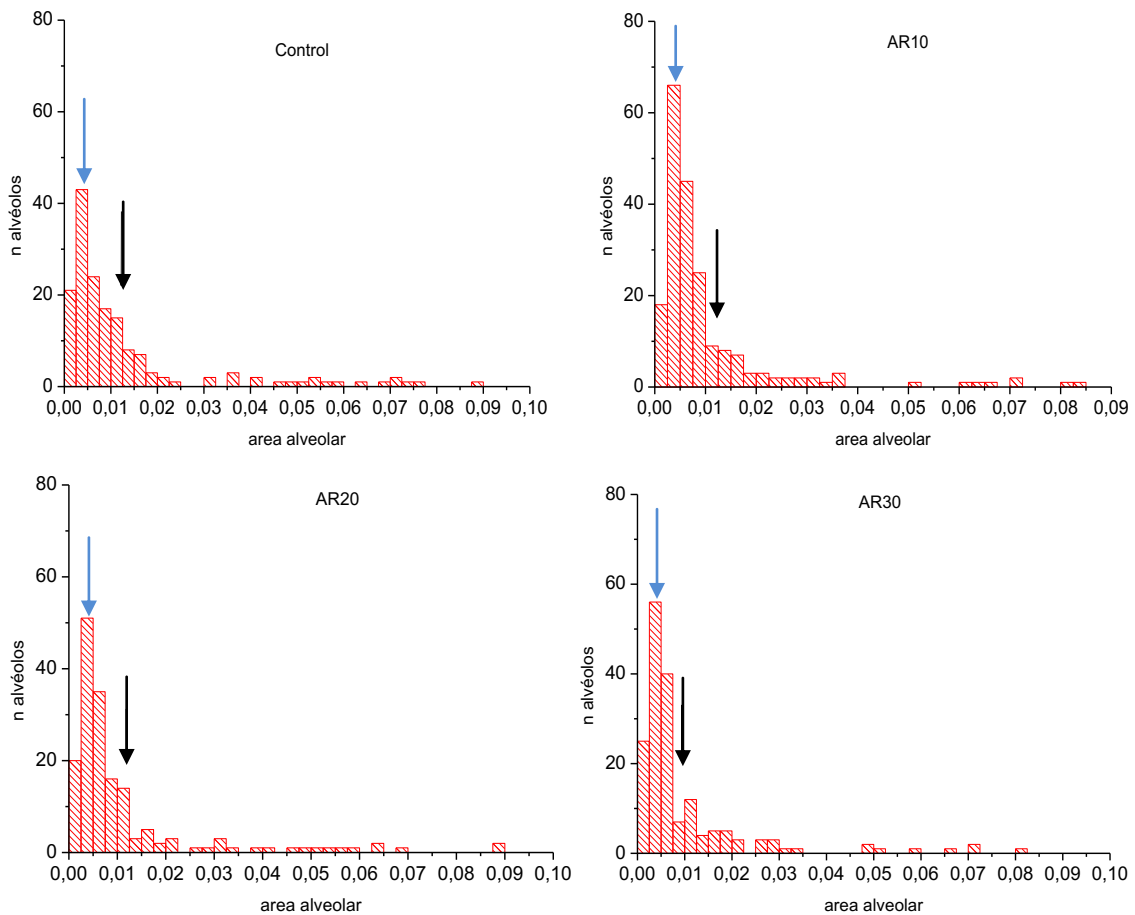
El reemplazo de harina de trigo por AR en un 30% ocasionó una disminución significativa del área alveolar total (expresada como porcentaje o fracción de aire) mientras que con los otros dos niveles no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto al control. Este parámetro representa a la proporción del área evaluada que contiene alvéolos (Zghal y col., 1999) por lo que menores valores se relacionan con migas menos aireadas. De este modo, estos resultados se encuentran en acuerdo con la tendencia hallada para el volumen específico de pan ya que con AR30 se encontró un volumen específico menor que para el control.

El perímetro, parámetro que se relaciona con la regularidad del contorno alveolar, exhibió una disminución significativa para AR30 respecto a las otras muestras. Para una misma área, menores valores del perímetro se asocian a una mayor regularidad del alvéolo. Por otro lado, la circularidad media, indicador de la simetría alveolar, no se vio afectada por la utilización de AR.

Se ha visto que el área alveolar determinada por este método se encuentra subestimada en aproximadamente un 34% (Zghal y col., 1999) sin embargo como herramienta para la comparación entre muestras resulta de utilidad ya que todas las muestras se ven afectadas de igual manera. Se calcularon el área alveolar media y la

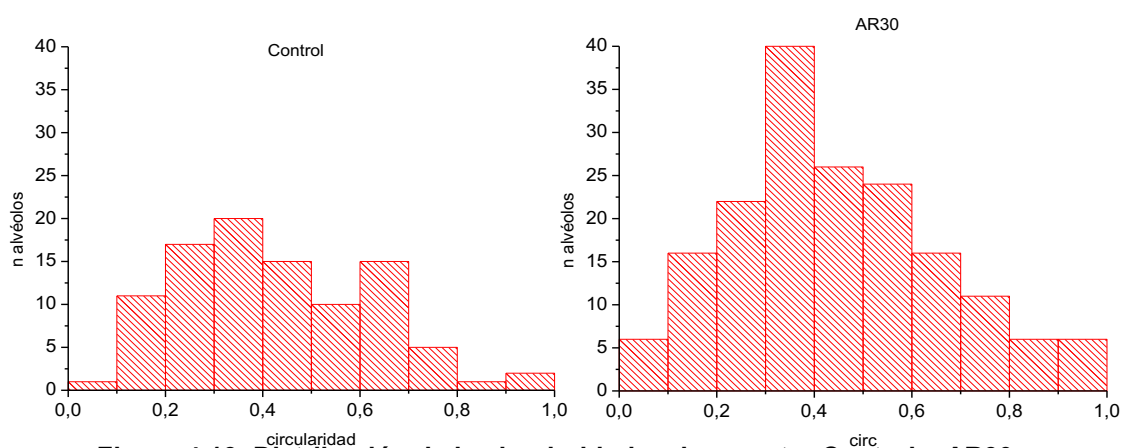
moda, o sea el valor de área alveolar más frecuente. Mientras que el área alveolar media disminuyó significativamente cuando AR se utilizó al 30%, en el valor de la moda no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes formulaciones. Los valores para la moda se encontraron entre 0,0028 cm<sup>2</sup> (AR20) y 0,0030 cm<sup>2</sup> (AR10, AR30). Por último, el número de alvéolos (N) se incrementó para la muestra AR30 con respecto al Control y a las otras formulaciones con AR. Por lo tanto, AR30 es la muestra que presenta mayores variaciones en el alveolado de la miga respecto al control. AR30 presenta alvéolos más pequeños y con mayor simetría.

En los histogramas de la Figura 4.12 se muestra la distribución del área alveolar para las cuatro formulaciones ensayadas. En los mismos puede apreciarse que, en general, se encuentran en mayor número los alvéolos de menor área que la media y que predominan los valores de área alveolar cercanos al valor de la moda. La distribución alveolar permite observar que los alvéolos de mayor tamaño (0,02 cm<sup>2</sup>), aunque se encuentren en menor número, ejercen gran influencia sobre el valor de la media. De este modo, la media y la moda del área alveolar nos están brindando información complementaria.



**Figura 4.12. Distribución del área alveolar para los panes control, AR10, AR20 y AR30. La flecha negra indica el valor de la media. La flecha azul indica la moda.**

En la Figura 4.13 se muestran a modo de ejemplo la distribución del parámetro circularidad en las muestras Control y AR30. A partir de los mismos puede observarse que la distribución para este parámetro no es la misma para las dos muestras. En la muestra control no se encontró el predominio de un rango de valores de circularidad lo que indicaría que no hay una forma predominante. En el caso de la muestra AR30 se observa que la distribución se encuentra centrada alrededor del rango de valores 0,3-0,4, lo cual nos indica que habría una forma predominante, la elíptica, dado que valores cercanos a 1 se relacionan con alvéolos más circulares. Este hecho podría estar indicando una cierta dificultad en la formación de los alveolos durante la fermentación debido probablemente a una menor deformabilidad de la pared.



**Figura 4.13. Distribución de la circularidad en la muestra Control y AR30.**

A partir de las Figuras 4.12 y 4.13 podemos decir que la utilización de AR ocasionó modificaciones en la distribución del área alveolar de la miga y también en la forma de los alvéolos entre las diferentes muestras. Estos cambios fueron más marcados en AR30, lo que condujo a variaciones significativas en los valores medios respecto a las otras muestras.

El aire presente en la miga es atrapado en la masa durante la etapa de amasado y en las etapas que siguen al amasado no se incorpora ni genera más gas, a pesar de la acción de los agentes leudantes (Baker y Mize, 1942), sino que sólo se afecta al tamaño de los alvéolos. De este modo, los núcleos para el desarrollo de los alvéolos de gas se generan durante el amasado (Scanlon y Zghal, 2001). Por lo tanto, las diferencias encontradas entre las formulaciones estudiadas pueden ser atribuidas a que la cantidad de aire incorporado en la etapa de amasado es distinta como consecuencia de la diferente consistencia de las masas. En las masas de menor

consistencia (Control, AR10) un mayor contenido de aire sería incorporado durante el amasado por lo que estas formulaciones presentaron un mayor porcentaje de aire en la miga y por lo tanto un mayor volumen específico de pan.

#### 4.4.2.3. Color de la corteza

La determinación del color de la corteza es un parámetro de calidad útil para evaluar por ejemplo cambios de formulación o del proceso de elaboración en productos panificados (Shittu y col., 2007). El color junto con la textura y el flavor son factores determinantes para la elección o no por parte del consumidor.

En la Tabla 4.6 se muestran las medias de los parámetros L, a y b obtenidos para la corteza de los panes.

**Tabla 4.6. Parámetros de color.**

Muestra	L	a	b
Control	55 ± 4 <sup>a</sup>	10 ± 1 <sup>d</sup>	24 ± 1 <sup>b</sup>
AR10	73 ± 1 <sup>c</sup>	4 ± 1 <sup>b</sup>	31 ± 3 <sup>d</sup>
AR20	65 ± 3 <sup>b</sup>	6 ± 1 <sup>c</sup>	25 ± 1 <sup>c</sup>
AR30	76 ± 3 <sup>c</sup>	1 ± 1 <sup>a</sup>	20 ± 2 <sup>a</sup>

Promedio ± Desvío estándar

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

Se realizó un análisis estadístico de cada parámetro para ver si había diferencias significativas entre muestras. Para L, se encontró que hay diferencias entre todas las muestras excepto entre AR10 y AR30, las cuales serían estadísticamente iguales. Para a y b, en cambio, todas las muestras son estadísticamente diferentes entre ellas. Estos resultados sugieren que la implementación de AR en la formulación de los panes incide en el color de los mismos luego del horneado.

Hay que señalar, que aunque en algunos casos se hallaron diferencias significativas en los parámetros, éstas pequeñas variaciones, detectables con el colorímetro, podrían tal vez no serlo por el ojo humano. Además, para todos los productos existe un rango de color en el que la aceptabilidad del producto no se ve modificada, el cual depende de la variabilidad en la preferencia entre los consumidores, la edad y el origen étnico, entre otros, (Mac Dougall, 2002) por lo que

las diferencias encontradas en el color de la corteza podrían no afectar la elección del consumidor.

#### 4.4.2.4. Ensayos de almacenamiento

##### 4.4.2.4.1. Humedad de la miga

En la Tabla 4.7 se exponen los valores de humedad de la miga de los panes para los diferentes días de almacenamiento. Se muestran también los incrementos porcentuales de la pérdida de humedad al día 3 de almacenamiento respecto del día de panificación (día 0).

**Tabla 4.7. Humedad de la miga**

Muestra	Humedad (%)			Pérdida de humedad (%)*
	Día 0	Día 1	Día 3	
Control	44,2 ± 0,1 <sup>c</sup>	43,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	37,2 ± 0,7 <sup>a</sup>	15,7
AR10	44,2 ± 0,1 <sup>c</sup>	42,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	39,5 ± 0,4 <sup>b</sup>	10,6
AR20	42,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	42,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	36,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	14,8
AR30	43,3 ± 0,1 <sup>b</sup>	42,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	37,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	12,9

\* Pérdida de humedad entre el día 3 y el día 0

Promedio ± Desvío estándar

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

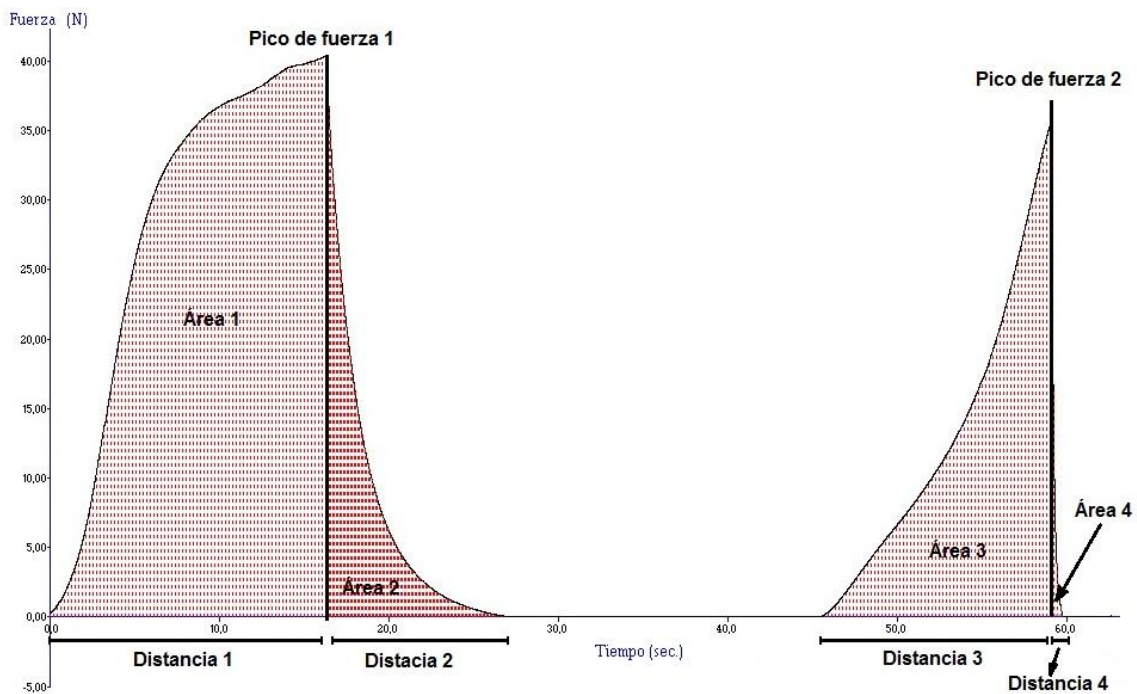
A pesar de que las masas de todas las muestras fueron preparadas con igual cantidad de agua, ya que todas las formulaciones presentaron igual absorción farinográfica, los valores de humedad de la miga no fueron iguales para todas las formulaciones. Se observaron menores valores de humedad de la miga en los panes con AR en el día 0 y en los que fueron almacenados durante un día respecto al control. Mientras que en el día 3 de almacenamiento no se observaron diferencias respecto al control, salvo para el caso de AR10.

En general, todas las muestras exhibieron una pérdida de la humedad de la miga con el tiempo de almacenamiento, no observándose grandes variaciones, respecto al control, por el empleo del AR.



#### 4.4.2.4.2. Textura de la miga de los panes almacenados

En la Figura 4.14 se muestra el perfil de textura mostrado por la miga de pan cuando es sometida al ensayo de compresión. Este perfil se diferencia del mostrado por la masa en que la miga no presenta adhesividad. A partir del análisis de las curvas se extrajeron o calcularon, según el caso, los parámetros característicos: dureza, consistencia, cohesividad, elasticidad, resiliencia y masticabilidad.



**Figura 4.14. Ensayo de TPA para la muestra AR20, en el día 3 de almacenamiento a 20 °C**

En la Figura 4.15 se muestran la dureza y la cohesividad de los panes a lo largo de los tres días de almacenamiento.

La dureza de los panes en el día 0 se incrementó significativamente cuando se reemplazó la harina de trigo por 20 o 30% de almidón. En cambio, no se observó una diferencia significativa al realizar un reemplazo del 10%. Se observó asimismo una disminución tanto de elasticidad como de la resiliencia (elasticidad instantánea) y de la cohesividad de la miga a medida que se incrementó la cantidad de AR agregado. Esto indica la formación de migas más duras, menos elásticas y menos integradas al agregar niveles altos de AR lo que significa una pérdida de calidad. Para los niveles de 10, 20 y 30% de reemplazo, las cantidades de proteína de gluten en la formulación

pasan de 11,9% (Control) a 10,8; 9,5 y 8,3% respectivamente. Estos valores están indicando una “dilución” de la red de gluten que afecta las características texturales de la miga.

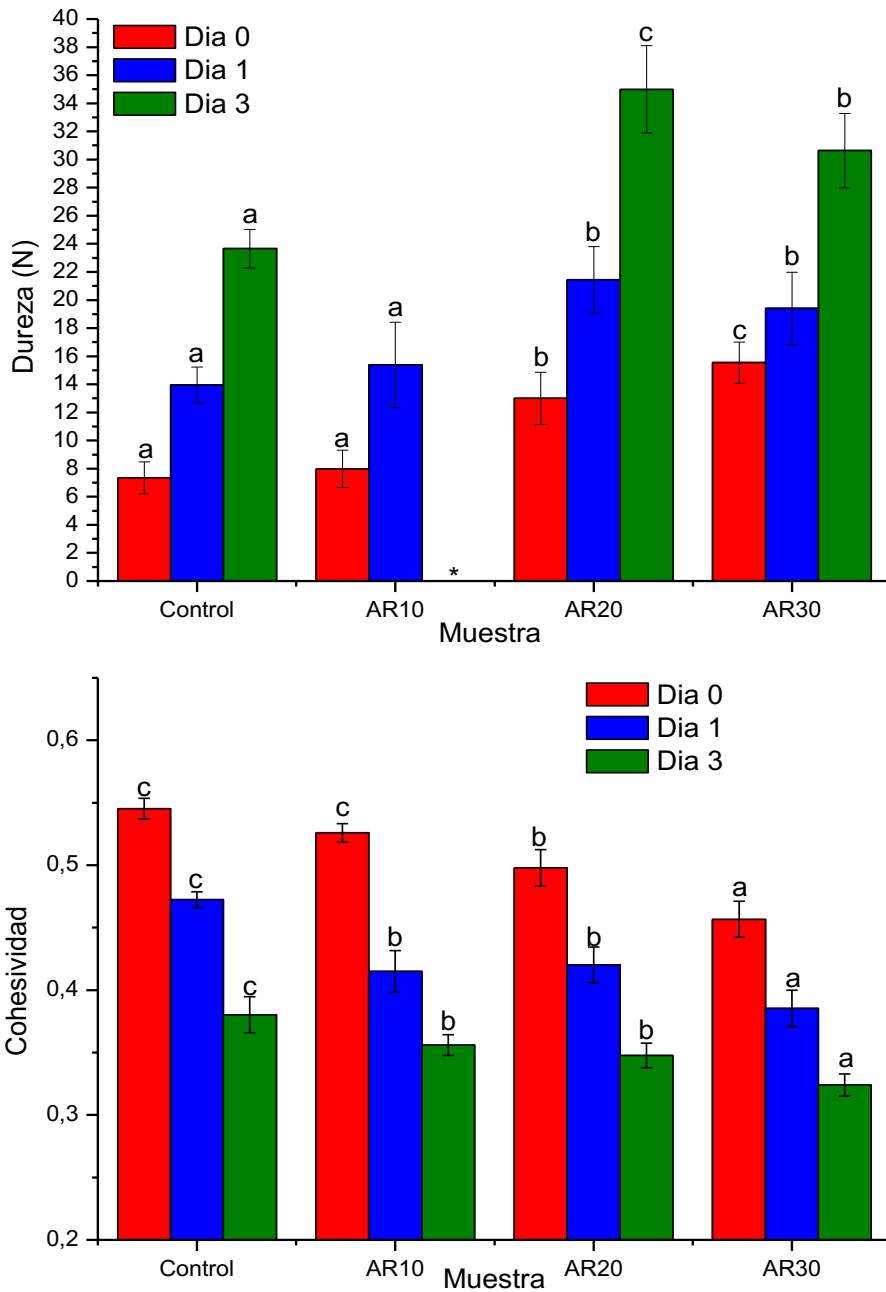
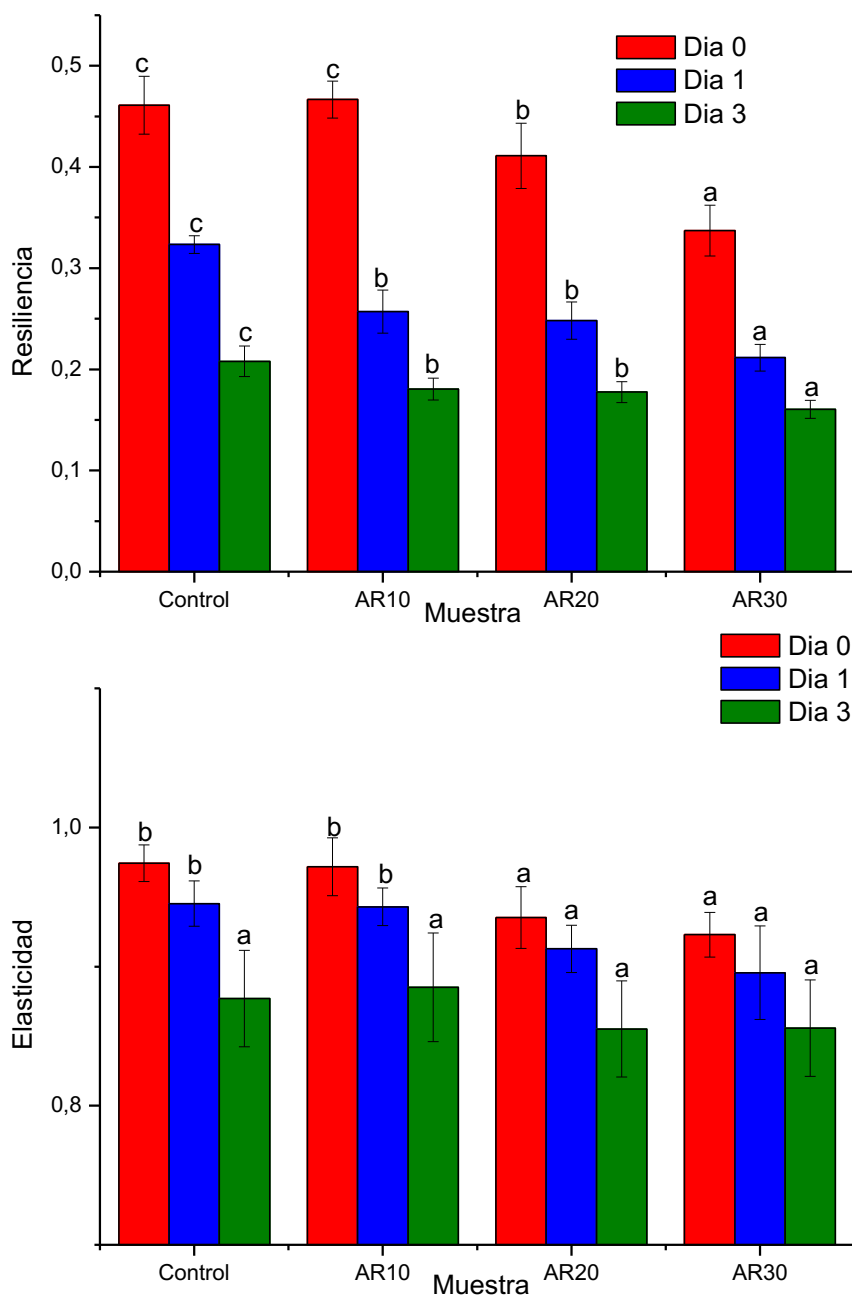


Figura 4.15. Dureza y cohesividad de la miga de los panes en los días 0, 1 y 3 de almacenamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las diferentes muestras para igual día de almacenamiento ( $P < 0,05$ ).

\*No determinado.



**Figura 4.16. Resiliencia y Elasticidad de la miga de los panes en los días 0, 1 y 3 de almacenamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las diferentes muestras para igual día de almacenamiento ( $P < 0,05$ ).**

Aunque el almacenamiento a temperatura ambiente produjo un aumento de la dureza en todos los casos sin embargo el incremento relativo porcentual (respecto al día 0) fue mayor para el Control (Tabla 4.8). También se verificó una pérdida creciente

de elasticidad y de cohesividad a mayores tiempos de almacenamiento sin embargo en este caso no se encontraron diferencias entre las distintas muestras.

**Tabla 4.8. Variaciones en los parámetros texturales durante el almacenamiento**

Muestra	Parámetro	Incremento relativo (%)		
		Día 1 – Día 0	Día 3 – Día 1	Día 3 – Día 0
Control	Dureza	89,98	69,44	221,92
	Cohesividad	-13,37	-19,50	-30,26
	Elasticidad	-2,98	-7,22	-9,98
	Resiliencia	-29,87	-35,69	-54,90
AR10	Dureza	92,87	nd	nd
	Cohesividad	-21,08	nd	nd
	Elasticidad	-2,95	nd	nd
	Resiliencia	-44,92	nd	nd
AR20	Dureza	64,93	66,97	175,38
	Cohesividad	-15,61	-17,28	-30,19
	Elasticidad	-2,40	-6,31	-8,57
	Resiliencia	-39,62	-28,48	-56,82
AR30	Dureza	24,82	57,87	97,06
	Cohesividad	-15,62	-15,89	-29,03
	Elasticidad	-2,97	-4,44	-7,28
	Resiliencia	-37,25	-24,14	-52,40

Valores positivos indican incremento, mientras que valores negativos indican decrecimiento.  
nd: no determinado

#### 4.4.2.4.3. Retrogradación

Los resultados obtenidos por calorimetría diferencial de barrido para las distintas muestras almacenadas se observan en la Tabla 4.9. Los termogramas correspondientes al día 0 no presentaron endotermas por lo que se puede inferir que la gelatinización fue completa durante el horneado. Los ensayos realizados después de 24 hs de almacenamiento no evidenciaron retrogradación de amilopectina para ninguna muestra. En el segundo día se observó una primera endoterma entre 45 y 80 °C en todas las muestras, y una segunda endoterma de menor área entre 85 y 101 °C solamente para las muestras donde hubo un reemplazo del 30% con almidón

resistente. Al tercer día de almacenamiento todas las muestras evidenciaron retrogradación, observándose ambas endotermas en todos los casos, aproximadamente en los mismos rangos de temperatura que en el segundo día.

**Tabla 4.9. Variaciones en los parámetros térmicos durante el almacenamiento**

Muestra	Ti1 (°C)	Tp1 (°C)	Tf1 (°C)	$\Delta H1$ (J/g)*	Ti2 (°C)	Tp2 (°C)	Tf2 (°C)	$\Delta H2$ (J/g)*
Día 0								
Control								
AR10								
AR20								
AR30								
Día 1								
Control								
AR10								
AR20								
AR30								
Día 2								
Control	44 ± 1 <sup>a</sup>	64 ± 1 <sup>a</sup>	80 ± 1 <sup>a</sup>	2,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	-	-	-	-
AR10	44 ± 1 <sup>a</sup>	63 ± 1 <sup>a</sup>	80 ± 1 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,7 <sup>a</sup>	-	-	-	-
AR20	45 ± 1 <sup>a</sup>	59 ± 0 <sup>a</sup>	77 ± 2 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	-	-	-	-
AR30	45 ± 1 <sup>a</sup>	59 ± 1 <sup>a</sup>	78 ± 2 <sup>a</sup>	1,5 ± 0,0 <sup>a</sup>	85 ± 2	92 ± 1	101 ± 1	0,11 ± 0,01
Día 3								
Control	43 ± 1 <sup>a</sup>	62 ± 1 <sup>a</sup>	79 ± 2 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	81 ± 1 <sup>a</sup>	94 ± 3 <sup>a</sup>	102 ± 1 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,03 <sup>a</sup>
AR10	44 ± 0 <sup>a</sup>	61 ± 2 <sup>a</sup>	78 ± 2 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	81 ± 1 <sup>a</sup>	95 ± 2 <sup>a</sup>	104 ± 0 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,05 <sup>a</sup>
AR20	43 ± 1 <sup>a</sup>	60 ± 1 <sup>a</sup>	80 ± 1 <sup>a</sup>	2,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	81 ± 1 <sup>a</sup>	94 ± 1 <sup>a</sup>	103 ± 2 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,08 <sup>a</sup>
AR30	43 ± 0 <sup>a</sup>	60 ± 1 <sup>a</sup>	79 ± 2 <sup>a</sup>	2,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	82 ± 0 <sup>a</sup>	91 ± 0 <sup>a</sup>	103 ± 0 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>a</sup>

\* Entalpía aparente en base seca

Promedio ± Desvío estándar

Letras diferentes para el mismo día y en una misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ )

En el caso de la primera endoterma, las entalpías no presentaron diferencias significativas entre las muestras ni tampoco hubo diferencias entre el segundo y tercer día de almacenamiento. Sin embargo, las áreas parecen tender a aumentar del día 2 al 3. La segunda endoterma solamente pudo medirse para la muestra AR30 en ambos días y pareciera presentar también una tendencia a aumentar.

Estos resultados indicarían que el almidón resistente no influye en el grado de retrogradación de amilopectina que se observa en el Control.

#### 4.5. Evaluación nutricional: determinación de la digestibilidad del almidón

La digestibilidad del almidón en un alimento depende de diversos factores entre los que se encuentran la composición, o sea la relación amilosa - amilopectina, la existencia de barreras físicas como en los granos de cereales enteros, la presencia e interacción con otros componentes del alimento como proteínas, lípidos y fibras, el pH y el procesamiento (Parada y Aguilera, 2011). En particular, en el caso del pan los cambios estructurales que ocurren durante la gelatinización facilitan la digestión del almidón al favorecer el acceso de las enzimas hidrolíticas.

En este trabajo se evaluó la cinética de hidrólisis del almidón en los panes control y con almidón resistente (Figura 4.17), la que se siguió a través de la formación de azúcares reductores (principalmente maltosa). Los panes con agregado de almidón resistente AR20 y AR30 mostraron una importante reducción de la cantidad de maltosa liberada por gramo de almidón a lo largo del tiempo. Así, luego de 60 min de hidrólisis el pan control presentó un valor de 65 mg maltosa/g almidón mientras que los panes con AR10, AR20 y AR30 arrojaron los siguientes valores 64; 23; y 12 mg maltosa/g almidón, respectivamente. Por lo tanto, el reemplazo de harina de trigo por almidón resistente conlleva una importante disminución del almidón disponible. El conocimiento de la velocidad a la cual es digerido el almidón reviste importancia ya que una rápida absorción producirá un aumento rápido y alto de la glucemia seguido por una caída abrupta de la misma mientras que una digestión lenta producirá una respuesta aplanada y sostenida en el tiempo.

En nuestro caso, hemos estimado el índice glicémico *in-vitro* o la tasa glicémica *in-vitro* para los panes con AR como la relación de áreas debajo de la curva

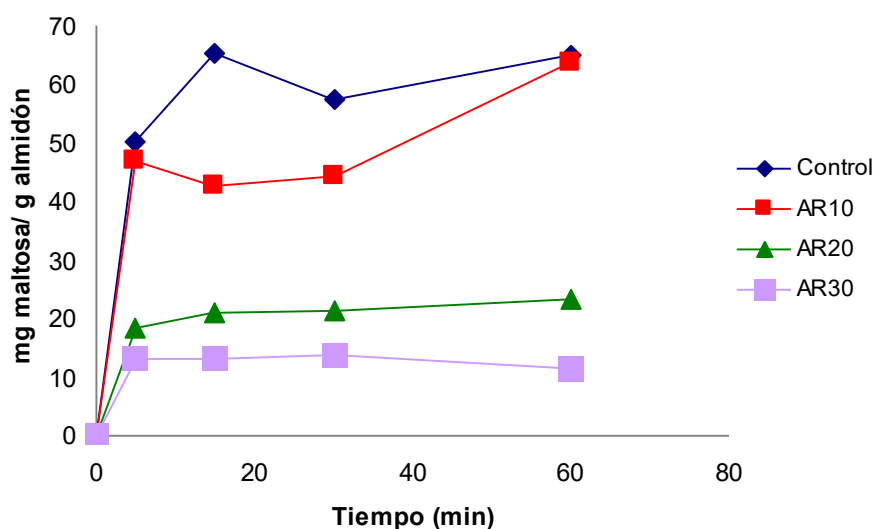


Figura 4.17. Cinética de la hidrólisis del almidón en los panes control, AR10, AR20 y AR30.

correspondiente a los panes con AR respecto al pan control. Los valores encontrados para la tasa glicémica *in-vitro* para los panes con AR fueron 82; 35 y 22 % para AR10, AR20 y AR 30, respectivamente. Por lo tanto, estos valores nos estarían indicando que el agregado de AR es una buena estrategia para la disminución del IG del pan tipo francés. En particular, el reemplazo de harina de trigo por AR en un 20 y 30% da lugar a productos con tasas glicémicas *in-vitro* que podrían catalogarse como saludables por lo que estos panes podrían ser recomendados en personas con desordenes en el metabolismo de los hidratos de carbono ya que darían lugar a menores incrementos de glucosa en sangre que un pan tipo francés común. Sin embargo, debemos remarcar que se tratan de valores *in-vitro* los cuales deberían corroborarse con ensayos *in-vivo*. Por otro lado, se debe tener en cuenta que la respuesta glucémica de un alimento depende tanto de su IG como de la cantidad ingerida (De la Plaza y col. 2013).

## **5. CONCLUSIONES**



Los ensayos farinográficos mostraron que la utilización de AR en las formulaciones de las masas no modifica sustancialmente la calidad panadera de la harina. No se observaron diferencias significativas respecto al control en los parámetros absorción de agua, tiempo de desarrollo, estabilidad y aflojamiento.

Los ensayos reológicos y microestructurales evidenciaron que el reemplazo de un 10% de harina de trigo por AR provoca cambios importantes en la matriz de las masas panarias. Esto se reflejó en los módulos  $G'$  y  $G''$  de los ensayos de reometría oscilatoria, y en los parámetros texturales dureza, consistencia, adhesividad, resiliencia y gomosidad. Se observó que, en general, la sustitución de harina por AR en un 20 o 30% no implica grandes variaciones en los parámetros mencionados respecto del Control, siendo el efecto más marcado siempre para AR10.

A través de la observación de las micrografías obtenidas por CSLM se pudieron visualizar diferencias en la conformación de la red de gluten. La muestra AR10 exhibió una apariencia más abierta y laxa, mientras que las otras muestras (Control, AR20 y AR30) resultaron con una estructura más cerrada y entrecruzada.

Los cambios observados en la reología de la masa y su microestructura podrían deberse al efecto de la interacción entre las cargas negativas del AR, las positivas de las proteínas de la red de gluten, y el efecto de apantallamiento debido a los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  de la sal en las formulaciones.

Los ensayos de DSC mostraron que las endotermas correspondientes a las muestras con AR no se desplazan respecto al Control, como se ve en las temperaturas de inicio, pico y fin de gelatinización. Esto podría atribuirse a la naturaleza del AR, el cual es almidón de trigo. Sin embargo, sí se encontraron valores crecientes de entalpías de gelatinización aparentes respecto del Control a medida que aumenta la concentración de AR en las muestras. Este fenómeno podría ser explicado en base al entrecruzamiento del AR, el cual requeriría de una mayor absorción de calor para gelatinizar.

Se encontró que existe un efecto negativo en el volumen específico al incorporar AR en concentraciones crecientes. Este resultado correlaciona con lo observado en la fermentación, ya que tanto el  $\Delta V_{\text{max}}$  como el tiempo de fermentación disminuyen con valores crecientes de concentraciones de AR. Los menores tiempos

de fermentación se atribuyen a los menores volúmenes finales alcanzados por las masas, siendo el  $\Delta V_{\max}$  de AR30 un 30% menor que el volumen máximo observado.

El análisis del alveolado indicó que se presentan variaciones en la estructura de la miga cuando se reemplaza la harina por un 30% de AR. Se observó que a este nivel la masa es menos aireada, con alveolos más pequeños, simétricos y con forma predominantemente elíptica, a diferencia de las demás muestras (Control, AR10 y AR20) donde las migas fueron más aireadas y presentaron mayor área alveolar promedio. Estos resultados también influyen en el volumen específico de pan, ya que una menor proporción de aire en la estructura implica un menor volumen final.

En general, la pérdida de humedad luego de 3 días de almacenamiento fue similar en todos los casos. Sin embargo, el empleo de AR podría conducir a un detrimento de la calidad textural de los panes ya que la dureza aumentó significativamente para AR20 y AR30, respecto del Control, aunque no hay un efecto significativo a un nivel del 10%. También se observa una disminución progresiva de los parámetros elasticidad, resiliencia y cohesividad a medida que aumenta la concentración de AR. Por lo tanto, su utilización resultaría en la obtención de panes con migas más duras, menos elásticas y menos integradas (menor calidad), posiblemente debido al efecto de dilución de la red de gluten por AR.

Los ensayos de DSC en miga realizados el día de la panificación revelaron que la gelatinización del almidón durante el horneado es completa. A su vez, se observaron endotermas de retrogradación similares para todas las muestras a partir de las 48 hs de almacenamiento. Esto indicaría que el AR no influye en el grado de retrogradación de la amilopectina, respecto del Control.

Los resultados de los ensayos de digestibilidad *in-vitro* del almidón mostraron que los panes presentan tasas glicémicas decrecientes a medida que se aumenta el nivel de sustitución, llegando a valores del 22% para AR30.

La incorporación de hasta un 30% de AR permite obtener masas aptas para la panificación con características reológicas aceptables. Pero, la calidad de los panes obtenidos se ve afectada con cantidades crecientes de reemplazo tanto en el volumen de pan como en la textura de la miga. A pesar de que la calidad sensorial se ve afectada, los panes presentan una disminución significativa de la digestibilidad del almidón, lo cual los haría aptos para ser incorporados en regímenes especiales.

## **6. REFERENCIAS**

Araya H., Contreras P., Alvina M., Vera G., Pak N. (2002). A comparison between an in vitro method to determine carbohydrate digestion rate and the glycemic response in young men. *European journal of clinical nutrition*, 56(8), 735-739.

Araya H. (2003). Valor nutricional de los hidratos de carbono complejos disponibles. En: *Avances sobre el uso y las propiedades de los carbohidratos de alimentos regionales. Proyecto CYTED XI 18*. Editores Wenzel E, Lajolo F., Ed. Universidad de Sao Paulo, Sao Paulo, pag 27-40.

Araya H, Lutz M. (2003). Alimentos funcionales y saludables. *Rev Chil Nutr*, 30: 8-14.

Araya, H y Alviña, M (2009) Productos de panificación funcionales. En: *Aspectos nutricionales y saludables de los productos de panificación*. Eds. MarianeLutz y Alberto León. Universidad de Valparaíso, Chile. pp 151-172

Asp, N.G. (1992). Resistant starch –Proceedings from the second plenary meeting of EURESTA:European FLAIR Concerted Action, 11 on physiologicalimplications of the consumption of resistant starch in man. Preface. *EuropeanJournal of ClinicalNutrition* 46:S1.

Augustin L. S., Franceschi S., Jenkins D. J., Kendall C. W., La Vecchia C. (2002). Glycemic index in chronic disease: a review. *Eur J Clin Nutr*, 56: 1049–1071.

Baker, J. C., Mize, M. D. (1942). The relation of fats to texture, crumb, and volume of bread. *Cereal Chemistry*, 19, 84-94

Baier-Schenk, A., Handschin,S., von Schönau, M., Bittermann, A.G., Bächli, T., Conde-Petit, B. (2005). In situ observation of the freezing process in wheat dough by confocal laser scanning microscopy (CLSM): Formation of ice and changes in the gluten network. *Journal of Cereal Science* 42: 255-260.

Bello-Pérez L., García-Suárez F., Méndez-Montealvo G., Oliveira do Nascimento J., Lajolo F., Cordenunsi B. (2006). Isolation and characterization of starch from seeds of *Araucaria brasiliensis*: a novel starch for application in food industry. *Strach/stärke*, 58: 283-291.

Bello-Pérez L., Méndez M. G., Agama E. (2006). En: Carbohidratos en alimentos regionales Iberoamericanos. Proyecto CYTED XI 18. Lajolo F, Wenzel E, editores. Editorial Universidad de Sao Paulo, Sao Paulo, pag 15-46.

Belton, P. S. (1999). On the elasticity of wheat gluten. *Journal of Cereal Science* 29: 103–107.

Belton, P.S. (2003). The molecular basis of dough rheology. Capítulo 13 en *Bread making Improving Quality*. Editado por Stanley P. Cauvain. Publicado por Woodhead Publishing Limited, Cambridge-Inglaterra

Bettge, A.D., Morris, C.F. (2000) Relationships among grain hardness, pentosan fractions and end-use quality of wheat. *Cereal Chemistry* 77 (2): 241-247.

Biliaderis, C.G. (1983). Differential scanning calorimetry in food reserch- A review. *Food Chemistry* 10: 239-265.

Biliaderis, C.G. (1992). Structures and phase transitions of starch in food systems. *Food Technology* 6: 98-109.

Bourne, Malcom (2002). Principles of objective texture measurement (Capítulos 3, 4, pp 107-187) en *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*. Academic Press, California, USA.)

Brand-Miller J. C. (2003). Glycemic load and chronic disease. *Nutr Rev*, 61: S49–S55.

Brown, I.L. (2004). Applications and uses of resistant starch. *Journal AOAC International*, 87: 727-732.

Carr, N.O., Daniels, N.W.R., Frazier, P.J. (1992). Lipid interactions in breadmaking. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 31: 237-258.

Cauvain, S.P. (2002), Pan: el producto (Capítulo1); Procesos de panificación (Capítulo 2). En: *Fabricación de pan* editado por Cauvain, S.P. y Young, L.S. Editorial Acribia S.A, Zaragoza, España.

Chinachoti P. (1995). Carbohydrates: functionality in foods. *Am J Clin Nutr*, 65: 922-929.

Ciacco C., Queiroz D., Vieira M. (2001). Amido Resistente. En: *Fibra dietética en Iberoamérica: tecnología y salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos*. Sao Paulo, Proyecto CYTED XI 6. Editores Lajolo F., Saura-Calixto F., Wittig E., Wenzel E. Ed. Livraria Varela, pag 130-138.

Código Alimentario Argentino (2011). [www.anmat.gov.ar](http://www.anmat.gov.ar). Capítulo IX-Alimentos Farináceos – Cereales, Harinas y Derivados.

Consenso sobre factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en pediatría. Obesidad. (2005). Elaborado por la Subcomisión de Epidemiología y Comité de Nutrición. *Arch. Argent. Pediatr* 103 (3).

Cornish G.B., Bekes F., Allen H.M., Martin D.J. (2001). Flour proteins linked to quality traits in an Australian doubled haploid wheat population. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52: 1339-1348.

Correa, M.J., Ferrer, E.G., Añón, M.C., Ferrero, C. Interaction of modified celluloses and pectins with gluten proteins. *Food Hydrocolloids* 35: 91-99.

C.W. Brabender Instruments, Inc. (2011). Disponible en: <http://www.cwbrabender.com/Farinograph-AT.html#!prettyPhoto> [light\_rounded]/1/ On line: 11/3/14.

De la Plaza M., Llanos, P., Pelayo, M.S., Zugasti, B., Zuleta, A. (2013). Revisión actualizada de los Hidratos de Carbono. Su implicancia en el tratamiento nutricional de la Diabetes. *Actualización en nutrición* 14 (2): 88-107.

Dengate, H.N. (1984). Swelling, pasting and gelling of wheat starch. *Advances in Cereal Science and Technology* 6: 49-82.

Deschamps, P.; Kulkarnia, P.P.; Gautam-Basak, M., Sarkar, B. (2005). Coord. *Coordination Chemistry Reviews*. 249, 895-909.

Dewettinck, K., Van Bockstaele, F., Kühne, B., Van de Walle, D., Courtens, T.M., Gellynck, X. (2008) Nutritional value of bread: Influence of processing, food interaction and consumer perception. *Journal of Cereal Science* 48: 243-257.

Dreese, P.C., Faubion, J.M., Hosney, R.C. (1988) Dynamic rheological properties of flour, gluten, and gluten-starch doughs. II. Effect of various processing and ingredient changes. *Cereal Chemistry* 65(4): 354-359.

Dürrenberger, M.B, Handschin, S., Conde-Petit, B., Escher, F. (2001). Visualization of food structure by confocal laser scanning microscopy (CLSM). *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 34: 11-17.

Edwards W. P. (2007). Capítulo 1: Introduction. Ed. Edwards W. P. Publicado por The Royal Society of Chemistry.

Eliasson, A.C. (2003). Starch structure and bread quality. Capítulo 7 en *Breadmaking Improving Quality*. Editado por Stanley P. Cauvain. Woodhead Publishing Limited. Cambridge, Inglaterra.

Englyst H., Kingman S., Cummings J. (1992). Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur J Clin Nutr*, 46(Suppl 2): S33-S50.

Englyst K.N., Englyst H.N., Hudson G.J., Cole T.J., Cummings J.H. (1999). Rapidly available glucose in foods: an in vitro measurement that reflects the glycemic response. *The American journal of clinical nutrition*, 69(3): 448-454.

Evans, I.D., Haisman, D.R. (1982). The effect of solutes on the gelatinization temperature range of potato starch. *Starch/Stärke* 34: 224.

Ebbeling C., Leidig M., Sinclair K., Seger-Shippe L., Feldman H., Ludwig D. (2005). Effects of an ad libitum low-glycemic load diet on cardiovascular disease risk factors in obese young adults. *Am J Clin Nutr*, 81: 976-982.

Ewart J.A.D. (1989). Hypothesis for how linear glutenin holds gas in dough. *Food Chemistry*, 32: 135-150.

FAO/WHO. (1998). Carbohydrates in Human Nutrition. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO Food and Nutrition, Paper No. 66.

Fido, R.J., Bekes, F., Gras, P.W., Tatham, A.S.(1997). Effects of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\omega$ -gliadins on the dough mixing properties of wheat flour. *Journal of Cereal Science* 26: 271–277.

Foster-Powell K., Holt S., Brand-Miller J. (2002). International table of glycemic index and glycemic load values: 2002. *Am J Clin Nutr*, 76: 5-56

Gan, Z., Ellist, P.R., Schofield, J.D. (1995). Gas Cell Stabilization and Gas Retention in wheat Bread Dough. *Journal of Cereal Science* 21: 215-230.

Ghiasi, K., Hosney, R.C., Varriano, E. (1982) Effects of flour components and dough ingredients on starch gelatinization. *Cereal Chemistry* 60 (1): 58-61.

Gómez Pallarés, M., Tadini, C.C., Pérez, G.T. (2009). Capítulo 4: Elaboración de productos de panificación especialmente formulados en Alternativas tecnológicas para la elaboración y conservación de productos panificados. Ed. Ribotta, P.D. Tadini, C.C. Publicado por Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba-Argentina.

Goñi I., Garcia-Alonso A., Saura-Calixto F. (1997). A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. *Nutrition Research*, 17(3): 427-437.

Granfeldt Y, Bjorck I, Drews A, Tovar J. (1992). An in vitro procedure based on chewing to predict metabolic response to starch in cereal and legume products. *European journal of clinical nutrition*, 46: 649-660.

Grosch, W., Wieser, H., (1999). Redox reactions in wheat dough as affected by ascorbic acid. *Journal of Cereal Science* 29: 1–16.

Hajselová, M. Analysing wheat and flour. Capítulo 9 en Bread making Improving Quality Editado por Stanley P. Cauvain. Publicado por Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra.



Hare-Bruun H., Flint A., Heitmann B.L. (2006). Glycemic index and glycemic load in relation to changes in body weight, body fat distribution, and body composition in adult Danes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84: 871-979.

Harwicz, P., Kovalskys, I. (2009). Capítulo 12. Síndrome metabólico en niños y adolescents en Enfoque Integral del Síndrome Metabólico. Segunda Edición. Ed. Lerman, J., Iglesias, R. Editorial Intermédica. Buenos Aires, Argentina.

Holm J., Björck I., Asp N.G., Sjöberg L.B, Lundquist I. (1985). Starch availability in vitro after flaking, steam-cooking and popping of wheat. *Journal of Cereal Science*, 3: 193-206.

Howitt, C:A., Tamás, L., Solomon, R. G., Gras, P.W., Morell, M. K., Békés, F., Appels, R. (2003). Modifying flour to improve functionality. Capítulo 11 en *Breadmaking Improving Quality* Editado por Stanley P. Cauvain. Publicado por Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra.

Jane, J. (2004). Starch: Structure and Properties. Capítulo 7 en *Chemical and functional properties of food saccharides*. Editado por Piotr Tomasik. CRC PRESS LLC. Boca Raton -Washington, D.C. Estados Unidos.

Jeffrey G.A., Saenger W. (1994). *Hydrogen Bonding en Biological Structures*, Springer-Verlag, Berlin.

Jekle, M., Becker, T. (2011). Dough microstructure: Novel analysis by quantification using confocal laser scanning microscopy. *Food Research International* 44: 984-991.

Jenkins D., Wolever T., Taylor R., Barrer H., Fielden H., Baldwin A., Newman H., Jenkins A., Goff D. (1981). Glycemic index of food a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am J Clin Nutr*, 34: 362-366.

Juárez Iglesias M., Perote Alejandro A. (2010). Presente y futuro de los alimentos funcionales. Cap. 3 en *Alimentos saludables y de diseño específico. Alimentos funcionales*. Ed. Instituto Tomás Pascual Sanz. Madrid, España.

Juárez M., Mariné A., (2008). Ingredientes funcionales. En *Nutrición y Alimentación. Nuevas perspectivas*. Ed. McGraw-Hill Interamericana; 233-52.

Karlsson, R., Olered, R., Eliasson, A.C. (1983). Changes in starch granule size distribution and starch gelatinization properties during development and maturation of wheat, barley and rye. *Starch/Stärke* 35: 335-340.

Khatkar, B.S., Bell, A. E., Schofield, J.D. (1995). The Dynamic Rheological Properties of Glutens and Gluten Sub-Fractions from Wheats of Good and Poor Bread Making Quality. *Journal of Cereal Science* 22: 29-44

Lai L. S., Kokini J. L., (1991). Physiochemical changes and rheological properties of starch during extrusion (a review). *Biotechnology Progress*. 7 251 266

Larrañaga, I.J., Carballo, J.M., Rodriguez, M; Fernández, J. 1997. *Dietética y dietoterapia*. Ed. Mac Graw-Hill Interamericana de España.

Lee, M.R., Swanson, B.G, Baik, B.K. (2001). Influence of amylose content on properties of wheat starch and breadmaking quality of starch and gluten blends. *Cereal Chemistry* 78 (6):701-706.

Levitan E., Mittleman M., Hakansson N., Wolk A. (2007). Dietary glycemic index, dietary glycemic load, and cardiovascular disease in middle-aged and older Swedish men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85: 1521-1526.

Lezcano, E. 2011. Productos panificados: cadenas alimentarias. En revista *Alimentos Argentinos* N°51. <http://www.alimentosargentinos.gov.ar/>

Li, W., Dobraszczyk, B.J., Wilde, P.J. (2004). Surface properties and locations of gluten proteins and lipids revealed using confocal scanning laser microscopy in bread dough. *Journal of Cereal Science* 39: 403-411.

Lindsay, M.P., Skerritt, J.H. (1999). The glutenin macropolymer of wheat flour doughs: structure-function perspectives. *Trend in Food Science and Technology* 10: 247-253.

Mac Dougall, D.B. (2002). *Colour measurement of food: principles and practice*. Capítulo 3 en *Color in Food. Improving Quality*. Editado por Mac Dougall, D.B. CRC Press LLC, Boca Raton FL, Estados Unidos.

Maloney, D.H., Foy, J.J. (2003). Yeast Fermentations. Capítulo 3 en Handbook of Dough Fermentations editado por Kulp, K. y Lorenz, K. Marcel dekker, inc. Nueva York, Estados Unidos.

Masi, P.; Cavella, S.; Sepe, M. (1998) Characterization of dynamic viscoelastic behavior of wheat flour doughs at different moisture contents. Cereal Chemistry 75 (5) 428-432.

McCleary B. V., Brown I. L. (2004). Novel dietary fibers: the importance of carbohydrates in the diet. Journal of AOAC International, 87: 681.

MGP Ingredients Inc., (2011). Atchison, Kansas. 866.547.2122

Mathers J., Wolever T. (2002). Digestion and metabolism of carbohydrates. En: Gibney M, Vorster H, Kok F, editores. Introduction to Human Nutrition. Blackwell Science, pag 69-80.

Metakovskii E.V., Wrigley C.W., Bekes F., Gupta R.B. (1990). Gluten polypeptides as useful genetic markers of dough quality in Australian wheats. Australian Journal of Agricultural Research, 41: 289-306.

Moon, M., Giddings, J. (1993). Rapid separation and measurements of particle size distribution of starch granules by sedimentation /steric field-flow fractionation. Journal of Food Science 58:1166-1171.

Newberry, M.P, Simmons, L.D., Morgenstern, M.P. (2003). Confocal visualisation of MDD dough development (263-266) - Capítulo:Gluten rheology and Functionality en The Gluten proteins:Lafiandra, D., Mascis, D'Ovidio R, Royal Society of Chemistry (Great Britan). Proceedings of the 8th Gluten workshop (Viterbo, Italia, 8-10 September, 2003)

Nugent, A.P. 2005. Health properties of resistant starch. British Nutrition Foundation , Nutrition Bulletin, 30, 27-54.

Pantanelli, A. 2009. Parámetros Industriales de la Calidad del Trigo. Disponible en: <http://www.roagro.com.ar/upload/varios/Par%C3%A1metros%20Calidad%20del%20Trigo.doc>. On line: 11/3/14.

Parada, J., Aguilera, J.M. 2011. Food Science and Technology International 17(3):0187–18

Pateras, I. (1998). Bread spoilage and staling (pp 240-261). En Technology of Breadmaking. Eds S P Cauvain y L S Young, London, Blackie Academic & Professional.

Peighambardoust, S. H., van der Goot, A. J., van Vliet, T., Hamer, R. J., Boom, R. M. (2006). Microstructure formation and rheological behaviour of dough under simple shear flow. Journal of Cereal Science 43: 183-197.

Pi-Sunyer F. X. (2002). Glycemic index and disease. Am J Clin Nutr, 76: 290S – 298S.

Qi L., Hu F. B. (2007). Dietary glycemic load, whole grains, and systemic inflammation in diabetes: the epidemiological evidence. Curr Opin Lipidol, 18: 3–8.

Rodríguez-Sandoval E., Fernández-Quintero A., Alaya-Aponte A. (2005). Reología y textura de masas: aplicaciones en trigo y maíz. Ingeniería e Investigación 57, 72-78.

Ross-Murphy S. B. (1988). Small deformation measurements. En: Blanshard, J. M. V. and J. R. Mitchel (Editors). Food Structure – Its Creation and Evaluation. Butterworths, London. pg 387 – 400.

Sahi S. S., Little K. (2006). Quality Control. Cap. 8 en Bakery Products – Science and technology. Editores Huy Y. H., Corke H., De Leyn I., Nip W. K., Cross N. Ed. Blackwell Publishing. Iowa, USA.

Scanlon, M.G., Zghal, M.C. (2001). Bread properties and crumb structure. Food Research International 34:841-864.

Schiraldi A., Fessas D. (2001). Mechanism of staling: an overview. Cap. 1 en Bread Staling. Editor Clydesdale F. M. Ed. CRC PRESS LLC. University of Massachusetts, Amherst

Sheard N., Clark N., Brand-Miller J., Franz M., Pi-Sunyer F., Mayer-Davis E. (2004). Dietary carbohydrate (amount and type) in the prevention and management of

diabetes: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 27: 2266–2271.

Shewry, P.R., Popineau, Y., Lafiandra, D., Belton, P. (2001). Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project. *Trend in Food Science and Technology* 11: 433-441.

Shittu, T.A., Raji, A.O., Sanni, L.O. (2007). Bread from composite cassava-wheat flour I. Effect of baking time and temperature in some physical properties of bread loaf. *Food Research International* 40: 280-290.

Stauffer, C.E. 1990 *Functional additives for bakery foods*. AVI Publishing Co. NewYork

Stauffer,C. (1998). *Fundamentos de formación de la masa* (pp. 309-347). En: *Fabricación de pan editado por Cauvain, S. y Young,L.* Acribia, Zaragoza.

Steffe, J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering* (Segunda edición.). East Lansing, Michigan: Freeman Press.

Tatham, A. S., Shewry, P. R. (1995). The S-poor prolamins of wheat, barley and rye. *Journal of Cereal Science* 22:1-16.

Tolstoguzov, V. (1997). Thermodynamic aspects of dough formation and functionality. *Food Hydrocolloids* 11(2): 193-197.

Topping, D.L. Fukushima, M, Bird, A.R. (2003).Resistant starch as a prebiotic and symbiotic: state of the art. *Proceedings of the Nutrition society* 62: 171-176

Walter. (2003). Disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fft-filter.html> On line: 12/3/14.

Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food microbiology* 24: 115-119.

Wolever T. M. (2003). Carbohydrate and the regulation of blood glucose and metabolism, *Nutr Rev*, 61: S40–S48.

Wolever T. M., Vorster H.H., Bjorck I., Brand-Miller J., Brighenti F., Mann J.I. (2003). Determination of the glycaemic index of foods: interlaboratory study. *Eur J Clin Nutr*, 57: 475–482.

Wrigley C, Andrews J, Bekes F, Gras P, Gupta R, MacRitchie F, Skerritt J. (1998). Protein-protein interactions-essential to dough rheology. En: *Interactions: The Keys to Cereal Quality*. Editado por Hamer R, Hoseney R. American Association of Cereal Chemists, Estados Unidos. pp. 18-20.

[es.wikipedia.org/wiki/Microscopio\\_confocal](http://es.wikipedia.org/wiki/Microscopio_confocal) On line: 12/3/14.

Zghal, M.C., Scanlon, M.G., Sapirstein, H.D. (1999). Prediction of bread crumb density by digital image analysis. *Cereal Chemistry* 76(5): 734-742.

Zobel, H.F., (1984). Gelatinization of starch and mechanical properties of starch pastes (285-309). Capítulo IX en *Starch Chemistry and Technology* (Segunda edición). Editado por Whistler, R.L., BeMiller, J.N., Paschall, E. Academic Press Inc. Florida, Estados Unidos.

El presente trabajo fue realizado con fondos de PIP CONICET 0354 y del proyecto acreditado UNLP 11X/517.